

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOOGIA UURIMISGRUPP

Liis Haljasmägi

**I tüüpi interferoonide vastased neutraliseerivad autoantikehad süsteemse erütematoosse
luupuse patsientidel**

Magistritöö (40 EAP)

Juhendajad PhD Kai Kisand

PhD Pärt Peterson

PhD Lili Milani

TARTU 2018

I TÜÜPI INTERFEROONIDE VASTASED NEUTRALISEERIVAD

AUTOANTIKEHAD SÜSTEEMSE ERÜTEMATOOSSE LUUPUSE PATSIENTIDEL

I tüüpi interferoonid (IFN) osalevad süsteemse erütematoosse luupuse (SLE) patogeneesis. Antud töö eesmärgiks oli uurida I tüüpi interferoonide vastaste autoantikehade esinemissagedust ja neutraliseerivat aktiivsust SLE patsientidel, ning nende mõju haiguse aktiivsusele. Sõeltestina kasutati lutsiferaasil põhinevat immuunsadestamise meetodit (LIPS) mitme erineva IFN- α subtüübi seguga. Uuriti 476 SLE patsiendi vereseerumit, millest 12% olid positiivsed anti-IFN α autoantikehade suhtes, mis kuulusid IgG1 alaklassi. I tüüpi interferoonide neutraliseerimise aktiivsust hinnati kasutades reporter-rakuliini. Pooltel positiivsetel SLE patsientidel esinesid neutraliseerivad anti-IFN α autoantikehad. IFN- α vastased autoantikehad püsivad peale tekkimist suhteliselt stabiilsena kogu haiguse vältel. IFN- α kontsentratsioon oli negatiivses korrelatsioonis anti-IFN α antikehade tasemega. SLE patsientide kliiniline info vajab täiendavat uurimist, kuid esialgsed tulemused lubavad oletada, et IFN- α -t neutraliseerivad autoantikehad võivad osaleda SLE haiguse aktiivsuse regulatsioonis.

Märksõnad: Autoimmuunsus, Autoantikehad, SLE, I tüüpi interferoonid

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

TYPE I IFN NEUTRALIZING AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Type I IFNs are implicated in the pathogenesis of Systemic lupus erythematosus (SLE). We hypothesized that autoantibodies towards type I IFNs, that develop in some patients with SLE, are neutralizing and may interfere with the course of the disease. Luciferase immunoprecipitation (LIPS) analysis was used to screen 476 SLE patient serum samples for the presence of IFN- α binding autoantibodies and determine their subclasses. Type I IFN neutralizing capacity of autoantibodies was tested using a reporter cell line. 12% of SLE patients were positive for anti-IFN α . The autoantibodies were of IgG1 subclass and neutralized IFN- α bioactivity in half of the positive cases. Once developed, anti-IFN α autoantibodies were present throughout the disease. IFN- α 2 and - α 8 were targeted first in two informative cases. The reactivity broadened to other IFN- α subtypes within several months. IFN- α concentration was negatively correlated with anti-IFN α antibody titers. The analysis of clinical data of the SLE patients is in progress. In conclusion, IFN- α neutralizing autoantibodies could modify the disease course of SLE.

Keywords: Autoimmunity, Autoantibodies, SLE, Type I interferons

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Autoantikehad	9
1.2 Autoantikehade jaotus.....	9
1.2.1 Organispetsiifilised autoantikehad	9
1.2.2 Mitte-organspetsiifilised autoantikehad	9
1.2.3 Tsütokiinide vastased autoantikehad	10
1.3 Autoantikehade roll.....	11
1.3.1 Autoantikehade diagnostiline roll	11
1.3.2 Autoantikehade patogeneetiline roll.....	12
1.4 Autoantikehade tekkemehhanismid	13
1.4.1 B-rakkude tsentraalne tolerantsus	13
1.4.2 B-rakkude perifeerne tolerantsus	14
1.4.2.1 Klonaalne deletsioon ja anergia perifeerses immuunsüsteemis	14
1.4.2.2 B-rakuline tolerantsus idutsentris	15
1.4.2.3 Anergiliste B-rakkude haaramine idutsentrisse.....	16
1.4.2.4 Anergiliste B-rakkude aktiveerimine lisasignaalide kaudu	17
1.5 Süsteemne erütematoosne luupus	18
1.5.1 Sümptomid	19
1.5.2 I tüüpi interferoonid SLE patsientidel	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1 Töö eesmärgid.....	23
2.2 Materjal ja meetodika	23
2.2.1 Uuritavad seerumid	23
2.2.2 LIPS (<i>Luciferase immunoprecipitation system</i>) analüüs.....	23
2.2.2.1 IFN- α vastaste autoantikehade tuvastamine SLE patsientide vereseerumist	23
2.2.2.2 SLE vereseerumi IFN- α vastaste immunoglobuliin IgG alaklasside detekteerimine	24
2.2.3 SLE patsientide vereseerumi neutraliseerimisvõime testimine.....	25

2.2.4 Statistiline analüüs.....	25
2.3 Tulemused.....	26
2.3.1 Autoantikehade esinemissagedus SLE patsientidel	26
2.3.2 SLE patsientidel domineerivad IgG1 alaklassi kuuluvad IFN- α vastased autoantikehad	26
2.3.3 SLE patsientidel esinevad IFN- α vastased autoantikehad omavad neutraliseerimisvõimet	27
2.3.4 Autoantikehade tasemed püsivad peale teket haiguse jooksul stabiilsena.....	28
2.3.5 Milline IFN- α subtüüp on SLE patsientidel esimeseks autoantikehade märklauaks?	29
2.3.6 IFN- α kontsentratsioon on negatiivses korrelatsioonis anti-IFN α autoantikehade tasemega.....	30
2.3.7 BILAG skoor on negatiivses korrelatsioonis IFN- α autoantikehade tasemega	32
2.4 Arutelu	34
KOKKUVÕTE	37
SUMMARY	38
TÄNUAVALDUSED.....	39
KASUTATUD KIRJANDUS	40
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
LIHTLITSENTS	50

KASUTATUD LÜHENDID

ACHR	Atsetüülkoliiniretseptor (<i>acetylcholine receptor</i>)
AID	Aktivatsioon-indutseeritud tsütidiini deaminaas (<i>activation-induced cytidine deaminase</i>)
ALPS	Autoimmuunne lümfoproliferatiivne sündroom (<i>autoimmune lymphoproliferative syndrome</i>)
ANA	Tuumavastane antikeha (<i>antinuclear antibody</i>)
AP	Aluseline fosfataas (<i>alkaline phosphatase</i>)
APECED	Autoimmuunne-poliendokrinopaatia-kandidoos ektodermaalne düstroofia (<i>autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy</i>)
AU	Suhteline ühik (<i>arbitrary unit</i>)
BAFF	B-raku aktivaator-TNF perekonda kuuluv tsütokiin (<i>B cell activating factor</i>)
Bcl2	B-rakuline lümfoom 2 (<i>B cell lymphoma 2</i>)
BCR	B-raku retseptor (<i>B cell receptor</i>)
BILAG	<i>British Isles Lupus Activity Group</i>
Bim	Bcl2-sarnane valk 11 (<i>Bcl-2-like protein 11</i>)
C5a	Komplementisüsteemi komponent (<i>complement</i>)
CD	Diferentseerumise klaster (<i>cluster of differentiation</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dsDNA	Kaheahelaline DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
ELISA	Ensüümivahendatud immunosorptsioonimeetod (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FAS	Apoptootilist rakusurma vahendav retseptor (<i>apoptotic receptor</i>)
FASL	Apoptootilist rakusurma vahendava retseptori ligand (<i>apoptotic ligand</i>)
FcR	Antikeha Fc-otsaga reageeriv retseptor (<i>immunoglobulin Fc fragment binding receptor</i>)
FcRn	Vastsündinute antikeha Fc-otsaga reageeriv retseptor (<i>neonatal Fc receptor</i>)
FDC	Folikulaarsed dendriitrakud (<i>follicular dendritic cell</i>)
GC	Idutsenter (<i>germinal center</i>)
GM-CSF	Kasvufaktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)

HSP	Kuumašokivalk (<i>heat shock protein</i>)
IC	Immuunkompleks (<i>immune complex</i>)
IC50	Keskmine inhibeeriv kontsentratsioon (<i>the half maximal inhibitory concentration</i>)
IFN	Interferoon (<i>interferon</i>)
IFNAR	I tüüpi interferoonide retseptor (<i>type I interferon receptor</i>)
Ig	Immunoglobuliin (<i>immunoglobulin</i>)
IL	Interleukiin (<i>interleukin</i>)
IPEX	X-liiteline immuundüsregulatsioon polüendokrinopaatia enteropaatia (<i>immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome</i>)
LIPS	Lutsiferaasil põhinev immuunsadestamine (<i>luciferase immunoprecipitation system</i>)
LU	Luminestsentsi ühik (<i>luminescence unit</i>)
MHC	Peamine koesobivuskompleks (<i>major histocompatibility complex</i>)
MS	Hulgiskleroos (<i>multiple sclerosis</i>)
NLR	Nukleotiide siduvad oligomerisatsioonidomeeni sisaldavad retseptorid (<i>NOD-like receptor</i>)
PBMC	Perifeersed vere mononukleaarsed rakud (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Fosfaadiga puhverdatud soolalahus (<i>phosphate buffered saline</i>)
pDC	Plasmatsütoidsed dendriitrakud (<i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
PRR	Patogeenide molekulaarseid mustreid äratundvad retseptorid (<i>pattern recognition receptors</i>)
RA	Reumatoidartriit (<i>rheumatoid arthritis</i>)
RAG	DNA rekombinaasi kodeeriv geen (<i>recombination activating gene</i>)
RF	Reumatoidfaktor (<i>rheumatoid factor</i>)
RLBA	Radioligand binding assay
SEM	Standardviga (<i>standard error of the mean</i>)
SHM	Somaatiline hüpermutatsioon (<i>somatic hypermutation</i>)
SiMoA	Single Molecul Array
SLE	Süsteemne erütematoosne luupus (<i>systemic erythematosus lupus</i>)

ssDNA	Üheahelaline DNA (<i>single stranded DNA</i>)
T1D	1. tüüpi diabeet (<i>type I diabetes</i>)
TBM	<i>Tingible body macrophage</i>
Tfh	Follikulaarne helper T-rakk (<i>follicular helper T cell</i>)
TGF- β	Transformeeriv kasvufaktor beeta (<i>transforming growth factor beta</i>)
Th	Helper ehk CD4+ T-rakk (<i>helper T cell</i>)
TLR	Tolli-sarnane retseptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tuumor-nekroosi faktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
Treg	Regulatoorne T-rakk (<i>regulatory T cell</i>)
TSHR	Türeotropiini retseptor (<i>thyroid stimulating hormone receptor</i>)

SISSEJUHATUS

Paljude autoimmuunhaiguste puhul on kirjeldatud tsütokiinide vastaste autoantikehade esinemist, nagu näiteks süsteemne erütematoosne luupus, reumatoidartriit (RA), autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos ektodermaalne düstroofia (APECED). SLE on süsteemne autoimmuunhaigus, mida iseloomustavad väga erinevad kliinilised sümptomid, mis mõjutavad paljusid organsüsteeme. I tüüpi interferoonid osalevad SLE haiguse etiopatogeneesis. SLE patsientidel esinevad patogeensed immuunkompleksid (IC), mis sisaldavad tuuma autoantigeene ning käituvad endogeensete I tüüpi interferoonide aktiveerijatena. Selle tulemusel tekib SLE patsientidel krooniline I tüüpi interferoonide aktivatsioon, mis soodustab patogeensete autoantikehade teket.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida I tüüpi interferoonide vastaste autoantikehade esinemissagedust ja neutraliseerivat aktiivsust, et välja selgitada, kas sellistel neutraliseerivatel autoantikehadel võib SLE haiguse puhul olla potentsiaalselt kasulik mõju haiguse aktiivsusele.

Antud magistritöö on kirjutatud Tartu Ülikooli Biomeditsiini õppekava raames. Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, Biomeditsiini osakonnas, Bio- ja Siirdemeditsiini Instituudis, Molekulaarpatoloogia uurimisgrupis. Magistritöö on tehtud koostöös London University College'i uurimisgrupiga, kellelt saadi SLE patsientide seerumid ja kliinilised andmed ning Pariisi Pasteuri Instituudi uurimisgrupiga, kes teostasid IFN- α kontsentratsiooni määramise SLE patsientide seerumitest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Autoantikehad

Autoantikehad tunnevad ära organismist pärit komponente ehk autoantigeene. Esimest korda kirjeldati autoantikehasid 1940-ndate lõpus. Autoantigeenid sisaldavad valke, nukleiinhappeid, lipiide, süsivesikuid või erinevaid kombinatsioone eelnimetatutest. (Elkon & Casali, 2008) Autoantigeenid võivad asuda tuumas, tsütoplasmas, rakupinnal või ekstratsellulaarses keskkonnas (Suurmond & Diamond, 2015). Tuumavastaseid antikehasid (ANA) ja reumatoidfaktoreid (RF) kirjeldati kui seerumi faktoreid, mis on võimelised seonduma tuuma antigeenidega ja immunoglobuliinidega (Suurmond & Diamond, 2015). Autoantikehad esinevad ka täiesti tervetel inimestel ning sageli on need IgM tüüpi, keskmise afiinsusega ja polüreaktiivsed ehk võimelised seonduma mitme erineva antigeeniga. Selliseid antikehi nimetatakse enamasti loomulikeks autoantikehadeks. Autoimmuunsete haigustega seotud autoantikehad on enamasti kõrge afiinsusega ning IgG tüüpi, kuid esineb ka erandeid.

1.2 Autoantikehade jaotus

1.2.1 Organispetsiifilised autoantikehad

Organispetsiifilistele autoimmuunhaigustele on iseloomulikud konkreetsele organile, koele või rakutüübile spetsiifilised autoantikehad, mis seonduvad kahjustatud koes olevate autoantigeenidega. Organispetsiifiliste autoantikehade teket stimuleerib sihtmärkorganis tekkiv põletikuline reaktsioon. (Elkon & Casali, 2008) Organispetsiifiliste autoimmuunhaiguste hulka kuuluvad näiteks 1. tüüpi diabeet (T1D) ja türeoidiit (Joonis 1). Organispetsiifilised autoantigeenid võivad olla erinevad rakumembraaniretseptorid (atsetüülkoliinretseptorid, hormoonide retseptorid), hormoonid (T3, T4), tsütoskeleti komponendid (neurofilamendid), ensüümid (kilpnäärme peroksüdaas, mao H-K-ATPaas, tsütokroom P450, glutamaatdekarboksülaas).


1.2.2 Mitte-organspetsiifilised autoantikehad

Organispetsiifikata autoimmuunhaiguste korral ei ole autoantigeenid piiratud ühe kahjustunud organiga, vaid on olemas pea kõigis keha rakkudes. Mitte-organspetsiifilised autoantikehad esinevad süsteemsete autoimmuunhaiguste korral ning reageerivad peamiselt kahjustunud rakkudest vabanenud antigeenidega. Koekahjustust vahendab sageli patogeenne antikeha-antigeen kompleks ehk immuunkompleks (Elkon & Casali, 2008). Organispetsiifikata autoimmuunhaigused on enamasti süsteemsed sidekoehaigused, näiteks süsteemne erütematoosne luupus ja reumatoidartriit (Joonis 1). SLE korral esinevad patsientidel

autoantikehad DNA, histoonide ja fosfolipiidsete antigeenide vastu, mille vahendusel tekivad kahjustused nahas, liigestes, neerudes. Organispetsiifikata autoantigeenide hulka kuuluvad erinevad rakutuuma komponendid (DNA, RNP, histoonid, tsükliin, Sp-100), tsütoskeleti komponendid (aktiin, tubuliin, keratiin), ensüümid (2-oksohapete dehüdrogenaasid, aminoatsüül tRNA süntetaasid, müeloperoksidaas), adhesioonimolekulid, kollageenid, kuumašoki valgud (HSP).

Autoimmuunhaiguste spekter

Organispetsiifilised autoimmuunhaigused



• Graves'i tõbi	(Kilpnääre: TSHR Abs, TPO Abs)
• Hashimoto türeoidiit	(Kilpnääre: TPO Abs, Tg Abs)
• 1. tüüpi diabeet	(Pankreas: GAD II Abs, IA2 Abs, ICA)
• Goodpasture sündroom	(Neerud: GBM Abs)
• Pernitsiosne aneemia	(Magu: Parietaalsete rakkude Abs)
• Primaarne biliaarne tsirroos	(Maks, Sapp: AMA Abs)
• <i>Myasthenia gravis</i>	(Lihased: AChR Abs)
• Dermato-/Polümüosiit	(Nahk/Lihased: Jo 1 Abs)
• Vaskuliit	(Veresooned: ANCA)
• Reumatoidartriit	(Liigesed: CRP, RF, RA33 Abs, Sa Abs)
• MCTD	(RNP Abs)
• <i>Scleroderma</i>	(Scl 70 Abs, CENP Abs, PM/Scl Abs)
• SLE	(ANA, Kardioliipiini Abs, Beta 2 GP I Abs)

Organispetsiifikata autoimmuunhaigused

Joonis 1. Autoimmuunhaiguste spekter. Joonisel on näidatud organispetsiifiliste ja süsteemsete autoimmuunhaiguste spekter koos haigustele iseloomulike autoantigeenidega.¹

1.2.3 Tsütokiinide vastased autoantikehad

Tsütokiinid on immuunsüsteemi virgatsained, mis osalevad immuunvastuse regulatsioonis. Tsütokiinid on oma olemuselt valgud ning need omavad epitoope, mis on immuuntolerantsuse murdumisel võimelised algatama immuunvastuse, vallandades autoantikehade tootmise (Meager & Wadhwa, 2014). Tsütokiinide vastased autoantikehad võivad esineda nii tervetel inimestel kui ka autoimmuunhaiguste korral. Tsütokiinide vastased autoantikehad võivad osaleda tsütokiinide bioloogilise aktiivsuse ning immuunvastuse regulatsioonis, neutraliseerides tsütokiinide aktiivsust või pikendades tsütokiinide poolestusaega tsütokiin-antikeha kompleksi moodustamise kaudu (Knight *et al.*, 2016; Courtney *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 2003). Tervetel inimestel esineb madalas tiitris tsütokiinide vastaseid autoantikehasid, samas infektsioonide ja autoimmuunhaiguste korral esinevad patsientidel kõrgemad tiitrid (Knight *et al.*, 2016). Selliseid autoantikehasid on kirjeldatud mitmete autoimmuunhaiguste

¹ <http://www.phadia.com/en-US/Autoimmunity-diagnostics/Diseases/>

korral, nagu näiteks reumatoidartriit, hulgiskleroos (MS), SLE ning APECED. Tsütokiinide vastased autoantikehad võivad osutada oluliseks mõningate autoimmuunsete haiguste aktiivsuse regulatsioonil (Ching *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2016). APECED patsientide seerumitest on leitud kõrges tiitris interleukiinide IL17A, IL17F, IL22 ja I tüüpi interferoonide vastaseid autoantikehasid (Meager *et al.*, 2006; Kisand *et al.*, 2010). Tsütokiinide vastased autoantikehad on sagedamini suunatud proinflammatoorsete tsütokiinide vastu, näiteks IL-1 α (Svenson *et al.*, 1989), TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) (Fomsgaard *et al.*, 1989), IL-6 (Hansen *et al.*, 1991), IL-8 (Peichl *et al.*, 1999), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Svenson *et al.*, 1998); anti-inflammatoorsete tsütokiinide IL-10 (Elkarim *et al.*, 1998), TGF- β (*transforming growth factor beta*) (Sjöwall *et al.*, 2004) vastu suunatud autoantikehasid on harvemini kirjeldatud (Cappellano *et al.*, 2012). IFN- γ neutraliseerivaid autoantikehasid on seostatud intratsellulaarsete infektsioonide esinemisega (Czaja *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2013; Nishimura *et al.*, 2015), IL17 ning IL22 neutraliseerivaid autoantikehasid vastuvõtlikkusega naha ja limaskestade kandidoosile (Kisand *et al.*, 2010). Tsütokiinide vastaste autoantikehade määramist on võimalik kasutada nii diagnostilistel kui ka haiguse prognostilistel eesmärkidel.

1.3 Autoantikehade roll

1.3.1 Autoantikehade diagnostiline roll

Paljude autoimmuunhaiguste korral esinevad autoantikehad juba enne haiguse esmakordset avaldumist, mistõttu on autoantikehasid võimalik kasutada biomarkeritena paljude autoimmuunhaiguste diagnoosi kinnitamisel, haiguse kulu jälgimisel ja haiguse ilmnemise/ägenemise ennustamisel (Castro & Gourley, 2010). Süsteemsete autoimmuunhaiguste puhul kasutatakse haiguse diagnoosimisel tuumavastaseid antikehasid, mille kõrge tiiter kinnitab haiguse diagnoosi. Samas esineb autoantikehasid ka väikesel protsendil tervetel inimestel ning nende puhul võib autoantikehade tiitrite tõus ennustada haiguse teket. Autoantikehade kasutamise diagnostilistel eesmärkidel teeb raskeks asjaolu, et nende tsirkuleerivad tiitrid on väga varieeruvad. Vaatamata sellele, on mõned autoantikehad väga olulised indikaatorid haiguse varajases faasis (Arbuckle *et al.*, 2003). Näiteks Ro (SS-A) ja La (SS-B) vastaste autoantikehade esinemine rasedatel naistel on oluline, näitamaks vastsündinute luupusesse haigestumise suurenenud riski (Buyon & Winchester, 1990).

Mõningate autoimmuunhaiguste korral on võimalik autoantikehade määramisega hinnata ravi efektiivsust ning haiguse prognostilist kulgu. Tsöliaakia korral ravitakse haigust gluteenivaba dieedi järgimisega, mille tulemusel väheneb transglutaminaasi vastaste autoantikehade tase (Uibo *et al.*, 2015). Katsed on näidanud, et I. tüüpi diabeeti põdevate patsientide lähisugulastest

haigestus diabeeti 150 inimest 3578-st ning 143 neist esinesid autoimmuunse diabeediga seotud autoantikehad, mis tõestab autoantikehade prognostilist tähtsust (Kulmala *et al.*, 1998). Reumatoidartriidi puhul on leitud seos RF kõrge tiitri ning haiguse aktiivsuse vahel – mida kõrgem RF tiiter, seda kiiremini haigus süveneb (Möttönen *et al.*, 1998; Wolfe & Sharp, 1998). Kahjuks on erinevate autoimmuunhaiguste puhul keeruline määrata optimaalset vanust, millest alates peaks mõõtma autoantikehade taset, et ennustada haiguse ilmingute kulgu ning tagada võimalikult varajane diagnoos. Paljud autoimmuunse diabeediga seotud autoantikehad ilmnevad juba varajas lapseas, samas türeoidiidiga seostatud autoantikehad ei teki enne 20-ndat eluaastat (Leslie *et al.*, 1999; Leslie *et al.*, 2001). Autoantikehade taseme mõõtmine võib osutuda oluliseks kui on vaja haigus kategoriseerida teatud alagruppideks – näiteks, kas on tegemist autoimmuunse või mitte-autoimmuunse haigusega (Leslie *et al.*, 2001).

1.3.2 Autoantikehade patogeneetiline roll

Autoantikehadel võib olla nii kahjustav kui ka kaitsev funktsioon. Süsteemsete autoimmuunhaiguste korral kahjustavad patogeensed autoantikehad/immuunkompleksid kudesid, süvendavad põletikulisi reaktsioone ning patogeensete B-rakkude aktivatsiooni (Elkon & Casali, 2008). Loomudelitel põhjal on näidatud, kuidas DNA vastaste autoantikehade ülekande või autoreaktiivse B-rakkude retseptori (BCR) ekspressiooni tulemusel tekib hiirtel neerudes põletik (Raz *et al.*, 1989; Kuhn *et al.*, 2006). Teatud autoantikehad teevad koostööd komplemendiga ja/või FcγR (*immunoglobulin Fc fragment binding receptor*) signaalirajaga, mis võib samuti viia põletikulise reaktsiooni tekkeni erinevates kudedes. Komplemendi aktivatsioon põhjustab anafülatoksiini C5a (*complement factor 5a*) vabanemist, mis meelitab ligi neutrofiile, vabanevad proteolüütilised ensüümid ning tõuseb põletikuliste tsütokiinide tootmine (Elkon & Casali, 2008). Kõrge afiinsusega IgG ja ka IgM autoantikehad on võimelised aktiveerima Fc retseptoreid, mille tulemusel aktiveeritakse mitmeid immuunrakke ning suureneb autoantikehade patogeensus (Suurmond & Diamond, 2015). Tänu defektidele apoptoosis suureneb lümfotsüütide kokkupuude intratsellulaarsete autoantigeenidega (Casciola-Rosen *et al.*, 1994). Autoantikehad moodustavad immuunkomplekse autoantigeenidega, mis kuhjuvad erinevates organites, põhjustades kudedes kahjustusi ning süsteemset põletikku (Isenberg *et al.*, 2007).

Autoantikehad võivad toimida ka retseptorite blokeerimise kaudu. Näiteks müasteenia korral esinevad atsetüülkoliini retseptorit (AChR) blokeerivad autoantikehad, mille tulemusel tekivad häired neuromuskulaarsetel ülekannetel (Drachman *et al.*, 1980). Autoantikehade kahjustav toime tuleb esile ka näiteks Graves'i haiguse korral, mis tekib türeotropiini retseptorit (TSHR)

stimuleerivate autoantikehade tulemusel ning tekitab hüpertüreoidismi (Chazenbalk *et al.*, 2002).

Mõningate haiguste puhul omavad tsütokiinide vastased autoantikehad kaitsvat ning prognostilist rolli. Reumatoidartriidi puhul on näidatud, kuidas IL-1 α vastaste autoantikehade taseme tõusmine korreleerub haiguse aktiivsuse vähenemisega (Graudal *et al.*, 2002), seetõttu on võimalik neid antikehasid kasutada varajase prognostilise markerina (Jouvenne *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1995). IFN- γ vastaseid autoantikehasid on seostatud kiirema taastumisega Guillain-Barre sündroomist (Elkarim *et al.*, 1998; Cappellano *et al.*, 2012) ja IFN- α -t neutraliseerivat toimet kaitsva efektiga 1. tüüpi diabeedi eest APECED patsientidel (Meyer *et al.*, 2016).

1.4 Autoantikehade tekkemehhanismid

1.4.1 B-rakkude tsentraalne tolerantsus

Lümfotsüütide eellasrakud paiknevad primaarsetes lümfoïdorganites (imetajate tüümus, luuüdi), kus B- ja T-rakkude arengu käigus toimub antigeeni retseptori geenides V(D)J rekombinatsioon, tagades primaarsete lümfotsüütide mitmekesisuse, mis on vajalik immuunvastuse tekkeks (Fugmann *et al.*, 2000). Luuüdis toimuva antigeeni retseptori geenide V(D)J rekombinatsiooni tulemusel tekib umbes 10¹² erinevat BCR-i ning 55-75% nendest B-raku retseptoritest omavad kõrget afiinsust lahustuvate, rakuliste või maatriksseoseliste autoantigeenide suhtes (Brink & Phan, 2018; Wardemann *et al.*, 2003). Teada on neli erinevat moodust, kuidas juba luuüdis vähendatakse B-rakulise autoimmuunsuse teket: klonaalne deletsioon, retseptori parandamine, klonaalne anergia ja ignorantsus (Goodnow *et al.*, 1988; Nemazee & Bürki, 1989; Gay *et al.*, 1993; Radic *et al.*, 1993).

Luuüdis tekkinud B-rakkudel, mis omavad kõrge afiinsusega BCR-i autoantigeenide suhtes, peatatakse edasine küpsemine ning sellised B-raku kloonid surevad apoptoosi teel – see on klonaalne deletsioon (Nemazee & Bürki, 1989; Hartley *et al.*, 1993). Defektid apoptoosis võivad viia B-rakulise tolerantsuse murdumiseni. Lisaks apoptoosile on autoreaktiivseid B-rakke võimalik kõrvaldada retseptori parandamise abil. Kui B-raku retseptor tunneb luuüdis tugevalt ära autoantigeeni, aktiveeritakse rekombinaasi-aktiveeriva geeni (RAG) valkude ekspressioon, mille tagajärjel viiakse läbi täiendavad V(D)J ümberkorraldused immunoglobuliini kerge ahela geenides (Gay *et al.*, 1993; Tiegs *et al.*, 1993). Retseptori parandamine esineb ainult ebaküpsete B-rakkude staadiumis, kui vahetult peale BCR ekspressiooni tuntakse ära autoantigeen (Ota *et al.*, 2011). Sellised rakud, millel ei õnnestu parandada BCR autoreaktiivsust, eemaldatakse luuüdis apoptoosi tulemusel (Nemazee, 2006).

Perifeersete B-rakkude uuringud on näidanud, et perifeersesse immuunsüsteemi satub luuüdist siiski ka autoreaktiivset retseptorit kandvaid B-rakke (Yurasov *et al.*, 2005). Suur osa neist on muudetud organismile ohutuks klonaalne anergia indutseerimisega (Goodnow *et al.*, 1988). See saavutatakse pinna IgM-i alla reguleerimisega, mis vähendab antigeeniga seondumisel saadavat BCR signaali. Luuüdis ei ole võimalik toleriseerida selliseid B-rakke, mille retseptorile seonduvaid antigeene ei ole võimalik luuüdis esitleda (Akkaraju *et al.*, 1997). See on klonaalne ignorantsus ja selliste B-rakkude inaktivatsiooni eest vastutavad perifeersed mehhanismid. Ebaküpsete B-rakkude tolerantsuse häireid luuüdis on eetilistel kaalutlustel inimestes keeruline uurida. Siiski on tsirkuleerivate naiivsete B-rakkude hulgas SLE patsientidel tuvastatud oluliselt rohkem autoreaktiivseid rakke kui tervetel isikutel, mis viitab B-rakkude tsentraalse tolerantsuse häiretele (Yurasov *et al.*, 2005). Sarnaseid defekte on leitud ka Sjögreni sündroomiga patsientidel (Glauzy *et al.*, 2017).

1.4.2 B-rakkude perifeerne tolerantsus

1.4.2.1 Klonaalne deletsioon ja anergia perifeerses immuunsüsteemis

Ignorantsete autoreaktiivsete B-rakkude kahjutuks muutmine toimub perifeerias luuüdist värskelt väljunud transitoorsete B-rakkude diferentseerumisel küpseteks naiivseteks B-rakkudeks (Wardemann *et al.*, 2003). Antigeeni seondumisel B-raku retseptoriga tõmmatakse antigeen endosoomidesse, kus toimub selle lagundamine väiksemateks peptiidideks. Lagundamisel saadud peptiidid seonduvad MHC-II (*major histocompatibility complex II*) klassi molekulidega. Samal ajal valmistatakse B-rakke ette vastu võtma helper T-rakkudelt (Th) tulenevaid signaale. Kui B-rakk-peptiid-MHC-II kompleks ei suuda 12-24 tunni jooksul peale antigeeniga seondumist ära tunda ning seonduda Th rakkudega, aktiveeritakse proapoptoetilised valgud Bim (*Bcl-2-like protein 11*) ja Bcl2 (*B cell lymphoma 2*) ning selline B-rakk suunatakse apoptoosi (Bouillet *et al.*, 1999; Enders *et al.*, 2003). Teise variandina kirjeldatakse ka anergia indutseerimist ehk pinnaretseptorite tiheduse vähendamist. Ka selles esimeses perifeerses kontrollpunktis on täheldatud defekte, näiteks SLE ja Sjögreni sündroomi korral (Yurasov *et al.*, 2005; Glauzy *et al.*, 2017). Kuna see B-rakkude tolerantsuse kontrollpunkt sõltub oluliselt T-rakkude tolerantsusest, siis pole imestada ka autoantikehade kõrget esinemissagedust APECED patsientidel, kellel on autoreaktiivsete T-rakkude hulk tümotsüütide negatiivse selektsiooni häire tõttu suurenenud (Fishman *et al.*, 2017).

Follikulaarsed dendriitrakud (FDC) esitlevad sekundaarsetes lümfoïdorganites (imetajate lümfisõlmed, põrn) küpsetele B-rakkudele antigeene, mis indutseerib B-rakkude aktivatsiooni ja diferentseerumise. Aktiveeritud B-rakk võib diferentseeruda lühiealiseks plasmarakuks, mis hakkab kiirelt sekreteerima madala afiinsusega IgM antikehasid, tagades esmase humoraalse

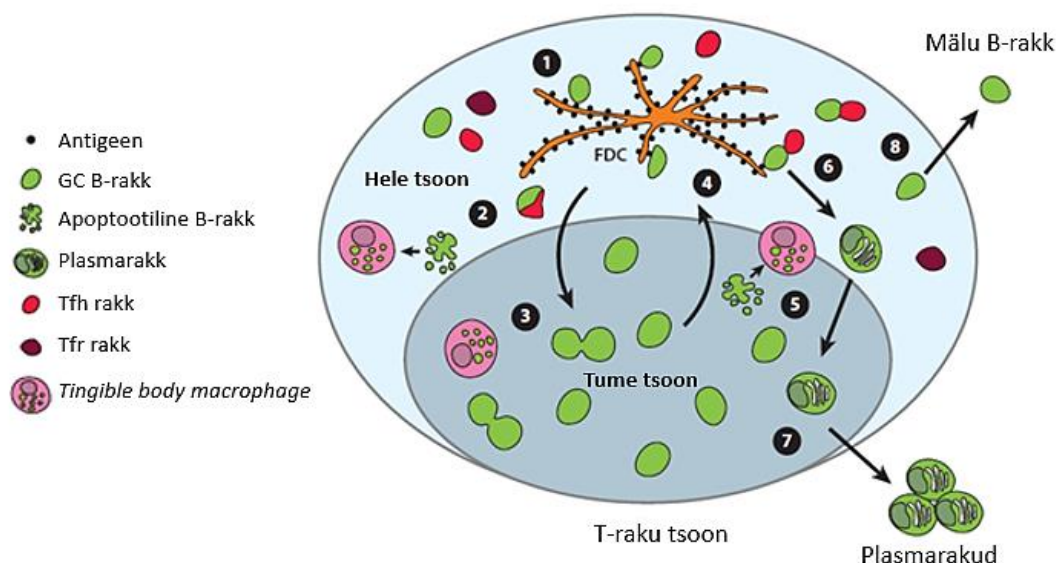
immuunvastuse. Alternatiivselt võib B-rakk diferentseeruda pikaajaliseks idutsentri (GC) B-rakuks – mälu B-rakuks või plasmarakuks, mis toodavad kõrge afiinsusega antikehasid, tagades pikaajalise humoraalse immuunsuse ning pannes aluse vaktsineerimise efektiivsusele (Plotkin *et al.*, 2008). B-rakkude diferentseerumine idutsentri rakkudeks sõltub B- ja helper T-rakkude vahelisest interaktsioonist (Chan *et al.*, 2009).

1.4.2.2 B-rakuline tolerantsus idutsentris

Idutsenter on perifeersetes lümfoidorganites asuv kõrgelt spetsialiseerunud immunoloogiline mikrokeskkond, kus toimub B-rakkude proliferatsioon, somaatiline hüpermutatsioon (SHM) ning immunoglobuliini isotüübi vahetus (Liu *et al.*, 1996)(Joonis 2). Antikehade afiinsusküpsemine toimub idutsentris T-rakkude kaasabil. Afiinsusküpsemise käigus toimuvad juhuslikud somaatilised mutatsioonid antikehade hüpervariaablites regioonides ning see avab võimaluse ka autoreaktiivsete B-rakkude tekkimisele. Autoantikehade varieeruva regiooni geenides olevad somaatilised mutatsioonid viitavad nende idutsentri päritolule ning esialgse antigeeni kindlaks tegemiseks on võimalik muteerunud autoantikehasid tagasi muuta iduliini või esialgseks mutatsioonideta antikehaks (Charles *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014). Suurem osa selliseid tagasi pööratud autoantikehasid tekivad algselt mitte-autoreaktiivsetest B-rakkudest, mis on oma autoreaktiivsuse omandanud idutsentris proliferatsiooni käigus (Charles *et al.*, 2013; Brink & Phan, 2018). Seetõttu on oluline mõista, milliste mehhanismide abil välditakse autoantikehade tekkimist normaalses idutsentrites.

B-rakkude aktiveerumisel T-rakkudest sõltuvalt kogunevad tulevased idutsentri B-rakud FDC rakkude ümbrusesse (Pereira *et al.*, 2009; Brink & Phan, 2018). Samal ajal B-rakkude proliferatsiooniga toimub GC küpsemine, mille tulemusel eristuvad hele ja tume tsoon, kus resideeruvaid B-rakke nimetatakse vastavalt tsentrotsüütideks ning tsentroblastideks. Heledas tsoonis asuvad follikulaarsed dendriitrakud, mis esitlevad enda pinnal immuunkompleksis asuvaid antigeene. Kui idutsentri B-rakk seondub FDC pinnal oleva antigeeniga ning saab signaali CD4⁺ follikulaarsetelt helper T-rakkudelt (Tfh), mis asuvad samuti heledas tsoonis, liiguvad sellised B-rakud idutsentri tumedasse tsooni (Victoria *et al.*, 2010). Tumedas tsoonis toimub idutsentri B-rakkude replikatsioon ning somaatiline hüpermutatsioon immunoglobuliinide varieeruvates geenides. SHM tulemusel tekkinud B-rakud, mis saavad kahjustada või kaotavad oma funktsiooni täielikult, eemaldatakse apoptoosi ja *tingible body makrofaagide* (TBM) poolt. Tumeda tsooni tsentroblastid naasevad tagasi heledasse tsooni, kus nad esitlevad uuenenud BCRi follikulaarsetele dendriitrakkudele ja konkureerivad Tfh rakkudelt saadava abi nimel. Eelise saavad B-rakud, mille BCRi afiinsus paraneb SHM tulemusel ning sellised idutsentri B-rakud saavad ellujäämissignaali, mille tulemusel need

suunatakse uuesti SHM-i või diferentseeruvad kõrge afiinsusega antikehi tootvateks plasmarakkudeks (Brink, 2014).



Joonis 2. Idutsentri ehitus ning seda moodustavad rakud. Numbrid 1 – 5 viitavad idutsentris toimuvale positiivsele selektsioonile. Numbrid 6 ja 7 tähistavad plasmarakkude diferentseerumist. Number 8 viitab mälu B-rakkude diferentseerumisele. Lühendid: FDC – follikulaarsed dendriitrakud; Tfh – follikulaarsed helper T-rakud; Tfr – follikulaarsed reguleerivad T-rakud. (Brink & Phan, 2018)

1.4.2.3 Anergiliste B-rakkude haaramine idutsentrisse

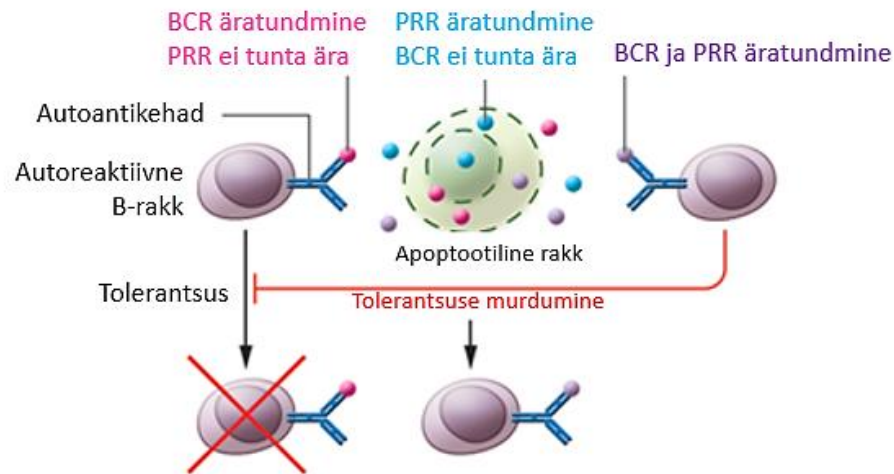
Vaatamata vähenenud BCR aktiivsusele on anergilised B-rakud siiski võimelised esitlema antigeene ning reageerima Th rakkudelt tulevatele signaalidele, nagu CD40L, IL-4 (Cooke *et al.*, 1994; Eris *et al.*, 1994). Kui anergiline B-rakk omab autoreaktiivset BCR-i, mis ristreageerib võõrantigeeniga, võivad Th rakud ära tunda võõra peptiidiga seotud epitoobi, mille tulemusel autoreaktiivne B-rakk saab abi helper T-rakkudelt ning hakatakse tootma autoantikehasid (Brink & Phan, 2018). Sellise olukorra vältimiseks on vajalik kahe TNF perekonna ligandide, CD40 ja FAS (*apoptotic receptor*), ekspressioon. Kui anergiline B-rakk-peptiid-MHC-II kaasab kompleksi Th raku, toimub CD40L ja CD40 seondumine B-raku pinnal, mille tulemusel indutseeritakse FAS retseptori ekspressioon. Th rakkude ligand FASL (*apoptotic ligand*) indutseerib FAS raja kaskaaside aktivatsiooni, mille tulemusel eemaldatakse anergiline B-rakk apoptootiliselt (Rathmell *et al.*, 1995; Garrone *et al.*, 1995; Rathmell *et al.*, 1996). Selline FAS-vahendatud apoptoos tagab perifeerse immuuntolerantsuse ennetades autoantikehade tootmist anergiliste B-rakkude poolt. Nii inimese kui ka hiire idutsentri B-rakud ekspresseerivad kõrgel tasemel FAS retseptorit ning mutatsioonid selles viivad autoimmuunse

lümfoproliferatiivse sündroomi (ALPS) ja autoantikehade tekkeni (Smith *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995).

Somaatilise hüpermutatsiooni käigus tekitatakse peamiselt punktmutatsioone antikehade varieeruvates regioonides, mis võimaldab parandada antigeeni afiinsust B-raku retseptori suhtes. Somaatilist hüpermutatsiooni viib läbi aktivatsioon-indutseeritud tsütidiini deaminaas (AID), mis deamineerib immunoglobuliini V(D)J järjestuses esinevad tsütidiinid, tekitades seeläbi ssDNA (*single stranded DNA*) katkeid, tühimikke ja ka kaheahelalise DNA (dsDNA) katkeid. B-raku DNA reparatsioonimehhanismid parandavad tekkinud kahjustused, mille tulemusel tekivadki punktmutatsioonid. Idutsentri B-rakud, mis omandavad somaatilise hüpermutatsiooni tulemusel kõrge afiinsuse autoantigeeni suhtes, suunatakse täiendavalt SHM-i seni kuni kaotatakse täielikult B-raku autoreaktiivsus (Burnett *et al.*, 2018). Autoreaktiivsed B-rakud, mis tunnevad ära koespetsiifilisi autoantigene, suudavad teatud juhtudel säilitada autoreaktiivsuse ning diferentseeruda autoantikehi sekreteerivateks plasmarakkudeks (Chan *et al.*, 2012).

1.4.2.4 Anergiliste B-rakkude aktiveerimine lisasignaali kaudu

Paljud autoantikehade poolt ära tuntavad antigeenid on võimelised aktiveerima mustri äratundmise retseptoreid (PRR), nagu Tolli-sarnased retseptorid (TLR) ja Nod-sarnased retseptorid (NLR). B-rakud ekspresseerivad TLR7 ja TLR9 retseptoreid, mille kaudu on võimalik B-rakke aktiveerida. Sellised autoantigeenid, mis on võimelised aktiveerima endosomaalset TLR ja B-raku retseptorit, indutseerivad B-rakkude aktivatsiooni (Suurmond & Diamond, 2015)(Joonis 3). TLR ekspressiooni tõus aktiveeritud või mälu B-rakkudes võimaldab B-rakkude aktivatsiooni ka idutsentris. BCR ja TLR koaktiveerimine idutsentris võib soodustada positiivset selektsiooni, mille tulemusel jäävad ellu autoreaktiivsed B-rakud, põhjustades B-rakulise tolerantsuse häirumise (Bernasconi *et al.*, 2003; Bourke *et al.*, 2003; Meyer-Bahlburg *et al.*, 2007). B-raku aktivaator-TNF perekonda kuuluva tsütokiini (BAFF) ekspressiooni tõusu ning TLR aktivatsiooni on seostatud T-rakkudest sõltumatu autoreaktiivsete B-rakkude aktivatsiooniga (Groom *et al.*, 2007; Herlands *et al.*, 2008). TLR aktiveerumine on suuteline algatama IgG isotüübi vahetuse, somaatilise hüpermutatsiooni ning T-rakkudest sõltumatu autoreaktiivsete B-rakkude diferentseerumise plasmarakkudeks (Ehlers *et al.*, 2006; Genestier *et al.*, 2007; Pone *et al.*, 2012).



Joonis 3. PRR aktivatsiooni roll autoreaktiivsete B-rakkude aktivatsioonis.

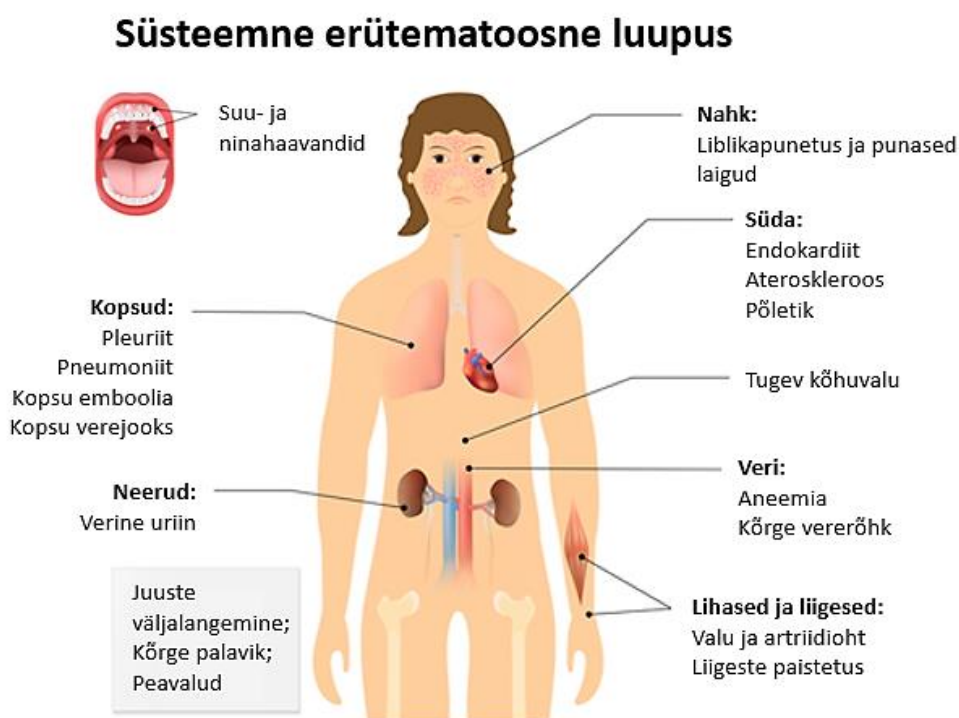
Autoantigeenid, mis seonduvad mustri äratundmise retseptoritega, nagu Tolli-sarnased retseptorid, on võimelised aktiveerima B-rakke. Autoantigeenide kombineeritud äratundmine BCR ja TLR-retseptori poolt võib viia tolerantsuse murdumiseni tänu autoreaktiivsete B-rakkude tekkele. (Suurmond & Diamond, 2015)

1.5 Süsteemne erütematoosne luupus

SLE on krooniline süsteemne autoimmuunhaigus, mille korral immuunsüsteem ründab organismi enda kudesid ning tekitab organismis põletikulise seisundi. SLE esineb sagedamini naistel. Luupuse korral esineb geneetiline eelsoodumus, kuid ainult 2% lastest, kelle emal on diagnoositud SLE, areneb see haigus. Mitmed keskkonnanafaktorid mõjutavad SLE patogeneesi, nagu näiteks ultraviolettkiirgus, mõned ravimid, viirusinfektsioonid, suitsetamine (Costenbader *et al.*, 2004). (Rose, Mackay, Petri, 2006) SLE patsiente iseloomustavad seerumis leiduvad dsDNA, RNA, kromatiini, RNA- ja DNA-seonduvate proteiinide ning fosfolipiidide vastased autoantikehad, mis omavad tähtsust ka haiguse diagnostikas (Hochberg, 1997; Tan *et al.*, 1982). SLE korral on kirjeldatud häireid apoptootilistes protsessides. Kui apoptootilisi rakke eemaldatakse liiga aeglaselt või esinevad defektid nende eemaldamisel, lähevad apoptoosi suunatud rakud sekundaarsesse nekroosi (Elkon & Casali, 2008). Selle tulemusel vabanevad apoptootilistest rakkudest rakusisesed komponendid (histoonid, dsDNA, RNA, RNP), mis satuvad ringlusesse, kus need on võimelised seonduma autoantikehadega. Apoptoosi tulemusel indutseeritakse tuumas erinevad modifikatsioonid, nagu histoonide tsitrullineerimine ja atsetülatsioon, mille tagajärjel on need võimelised seonduma autoantikehadega. (Dieker *et al.*, 2007; Dwivedi & Radic, 2014; Suurmond & Diamond, 2015)

1.5.1 Sümptomid

SLE patsientide kliiniline pilt on väga varieeruv, kuna haigusesse on kaasatud erinevad organid (Joonis 4). Enamasti on haiguse tulemusel kahjustunud nahk, lihas- ja skeletisüsteem ning neerud. Naha korral on kõige levinumateks sümptomiteks valgustundlikkus, liblikakujuline punetus näol, punetav täpiline nahk, suu ja nina limaskestade haavandid. Lihas- ja skeletisüsteemi kahjustuste korral on levinumateks kaebusteks artriit, valud liigestes ning paistetus. Neerukahjustuste korral võib esineda proteinuuria, hematuuria ja lõpuks võib neerukahjustus süveneda neerupuudulikkuseks. Lisaks kõikidele eelnevatele sümptomitele esineb luupuse patsientidel tihti kõrge palavik, peavalud, juuste väljalangemine. Iga luupuse patsient on isemoodi – mitte ühelgi patsiendil ei esine täpselt samasugused sümptomid. Mõnel patsiendil võivad sümptomid tekkida järsult, mõnel aga arenevad pika perioodi vältel. Haigushood võivad olla kas „ägedad“ ehk raskekujulised või „kerged“ ning haigushoogude kestvus võib olla väga varieeruv patsientide seas.



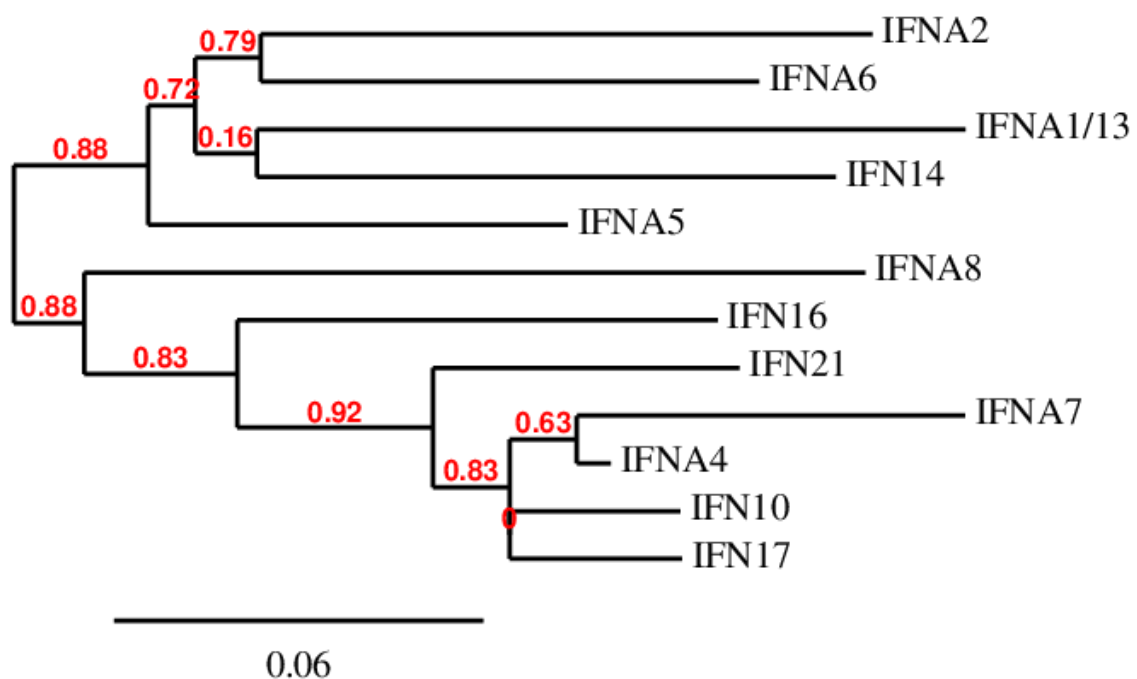
Joonis 4. Süsteemse erütematoosse luupuse sümptomid. Pildil on näidatud põhilised SLE sümptomid erinevate organsüsteemide seas.²

1.5.2 I tüüpi interferoonid SLE patsientidel

I tüüpi interferoone toodetakse vastusena nii viiruslike kui ka autoantigeenide esinemisele organismis. I tüüpi interferoonid on IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω . IFN- α toodavad

² <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/systemic-lupus-erythematosus>

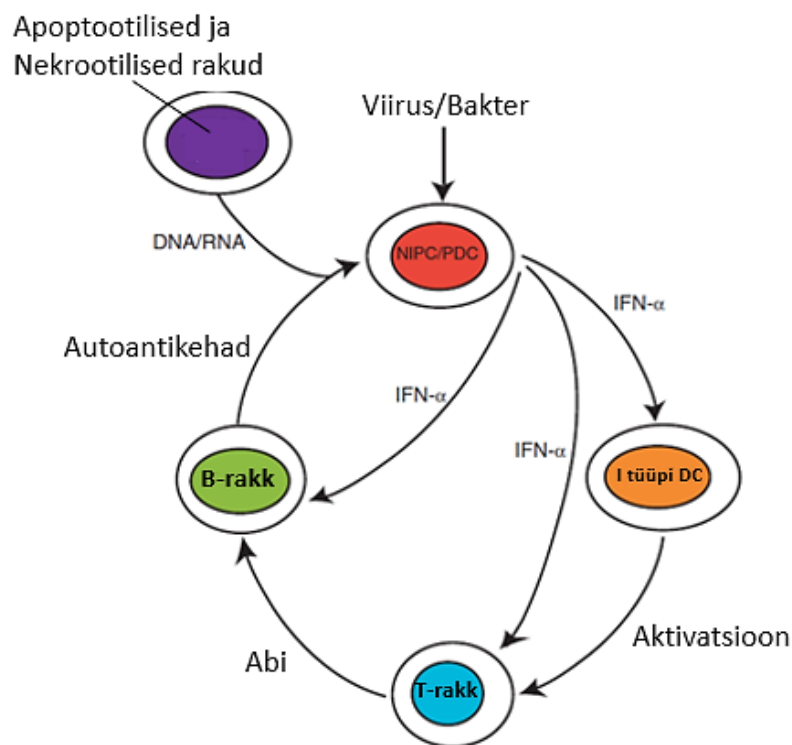
eelkõige immuunrakud - kõige suurema osa neist sekreteerivad plasmatsütoidsed dendriitrakud (pDC); IFN- β toodavad kõik viirusega nakatunud tuumaga rakud (Fitzgerald-Bocarsly *et al.*, 2008; Uibo *et al.*, 2015). I tüüpi IFN-id seonduvad I tüüpi interferoonide retseptoriga (IFNAR). IFN- α puhul on eristatavad 13 erinevat subtüüpi, mida kodeerivad 13 homoloogset geeni, mis asuvad klasterdunult üheksandas kromosoomis (Rönnblom, 2016)(Joonis 5). I tüüpi interferoone kodeerivate järjestuste homoloogia seisneb sama retseptori äratundmises ja sekreteeritavate valkude sarnasel struktuuril, samas erinevad kõik IFN- α alatüübid üksteisest ekspressioonitaseme poolest (Chen *et al.*, 2004).



Joonis 5. Inimese I tüüpi IFNA valkude fülogeneetiline analüüs. Inimese IFNA valkude järjestused saadi Genbank'ist. Järjestused joondati ning fülogenees tehti PhyML ja TreeDyn programmiga. (Fishman *et al.*, 2017)

I tüüpi interferoonide suurenenud ekspressioon ning ebaefektiivne apoptootiliste rakkude eemaldamine iseloomustavad nii luupust põdevaid patsiente kui ka hiiremudeleid (Shao & Cohen, 2011; Banchereau & Pascual, 2006). Viirusliku infektsiooni tulemusel aktiveeritakse I tüüpi interferoonide produktsioon ning toimub autoantigeenide vabanemine surnud rakkudest. Moodustuvad interferogeensed immuunkompleksid, mis käituvad endogeensete IFN- α indutseerijatena ning aktiveerivad plasmatsütoidsed dendriitrakke tootma I tüüpi interferoone. IFN- α tootmise tulemusel aktiveerunud dendriitrakud on võimelised aktiveerima autoreaktiivseid Th rakke. Aktiveeritud T-rakud omakorda stimuleerivad B-rakke tootma autoantikehasid RNA- ja DNA-seonduvate valkude vastu. Autoantikehade suurenenud

tootmise või infektsioonide tulemusel moodustub aina rohkem uusi immuunkomplekse, mis jällegi indutseerivad IFN- α tootmise. Kokkuvõttes tekib krooniline I tüüpi interferoonide produktsioon, mis vallandab organismis autoimmuunsed protsessid ja kroonilise põletiku (Joonis 6). (Rönnblom, 2016; Rönnblom & Alm, 2003) Üleliigne IFN- α ekspressioon aitab kaasa SLE patogeensusele, suurendades plasmarakkude diferentseerumist, autoantikehade tootmist ning T-rakkudest sõltuvat põletiku teket (Niewold *et al.*, 2010).



Joonis 6. I tüüpi interferoonide roll SLE etiopatogeneesis. Joonisel on välja toodud põhilised IFN- α indutseerijad ja märklaudrakud. Viirusliku/bakteriaalse infektsiooni tagajärjel hakkavad plasmatsütoidsed dendriitrakud tootma IFN- α , mis omakorda indutseerib 1. tüüpi dendriitrakkude arengu, T- ja B-rakkude aktivatsiooni. Apoptoosi tulemusel vabanenud DNA- ja RNA-seonduvad valgud ning B-rakkude poolt toodetud autoantikehad moodustavad immuunkomplekse, mis käituvad endogeensete IFN- α aktiveerijatena. See põhjustab ülemäärase IFN- α tootmise, mis stimuleerib autoimmuunsuse teket. Lühendid: NIPC – loomulikud IFN- α tootvad rakud; PDC – plasmatsütoidsed dendriitrakud (Rönnblom & Alm, 2003)

Hooks *et al.* näitas oma töös, kuidas I tüüpi interferoonide kõrge tase korreleerub SLE patsientide haiguse aktiivsusega (Hooks *et al.*, 1979; Ytterberg & Schnitzer, 1982). Mikrokiipide analüüs SLE patsientidelt pärinevate perifeersete vere mononukleaarsete rakkudega (PBMC) tuvastas paljude IFN-stimuleeritud geenide üleekspressiooni, mis tõestab I

tüüpi interferoonide olulisust SLE patogeneesis (Knight *et al.*, 2016). SLE patsientidel on kirjeldatud IFN- α vastaste autoantikehade esinemist, kuid nende esinemissagedus ja olulisus haiguse kulu modifitseerijatena ei ole teada.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Hüpotees: SLE patsientidel haiguse jooksul tekkivad I tüüpi IFN-de vastased autoantikehad neutraliseerivad interferoonide bioloogilist toimet ja vähendavad nende kontsentratsiooni vereseerumis ning modifitseerivad haiguse kulgu.

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

- 1) Hinnata I tüüpi interferoonide vastaste autoantikehade esinemissagedust SLE patsientidel.
- 2) Uurida, kas SLE patsientidel esinevad I tüüpi IFN vastased autoantikehad on võimelised neutraliseerima.
- 3) Hinnata autoantikehade dünaamikat ajas.
- 4) Leida autoantikehade IgG alaklasside jaotused
- 5) Võrrelda IFN- α seerumi kontsentratsiooni IFN- α -t neutraliseerivate antikehade tasemega.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Uuritavad seerumid

Käesoleva magistritöö raames uuriti 476 SLE patsiendi vereseerumeid, mis saadi koostöös Londoni University College'ga.

- Katseid jätkati 60 patsiendiga, kellest 43 naist (vanuses 4-82) ja 4 meest (vanuses 30-80), 13 patsiendi sugu teadmata.
- Dünaamikas uuriti viit SLE patsienti, kellest 4 naist (vanuses 55-85) ja 1 mees (vanuses 42).
- Kasutati 36 kontrolli, kellest 18 naist (vanuses 32-77) ja 18 meest (vanuses 33-74).

2.2.2 LIPS (*Luciferase immunoprecipitation system*) analüüs

2.2.2.1 IFN- α vastaste autoantikehade tuvastamine SLE patsientide vereseerumist

Lahjenduste tegemiseks kasutati puhvrit (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100).

IFN- α erinevaid subtüüpe kodeerivate järjestuste kloonimiseks kasutati pPK-CMV-F4 plasmidi (PromoCell GmbH, Saksamaa), millel *Firefly* lutsiferaas on asendatud *NanoLuc* lutsiferaasi kodeeriva järjestusega (Promega, USA) ning lisatud on uuritav antigeen. Kõikide

IFN- α antigeenide lutsiferaasi-liitvalkude ekspresseerimiseks kasutati inimese embrüonaalset neerurakuliini HEK293. Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Lonza, Šveits) söötmes, millesse oli lisatud 10% FBS, 100 U/ml penitsilliini ja 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomütsiini. Rakke kasvatati 37°C, 5% CO₂ koekultuuri inkubaatoris. Kloneerimine teostati teiste uurimisgrupi liikmete poolt.

96-kannulisele filterplaadile (Merck Millipore, Saksamaa) pipeteeriti 25 μl patsientide ning kontrollisikute vereseerumi 1:10 lahjendust, millele lisati juurde 25 μl Proteiin G agaroskerade suspensiooni (Exalpha Biologicals, USA) ja inkubeeriti toatemperatuuril loksutil üks tund. Seejärel pipeteeriti filterplaadi igasse kannu 50 μl 10⁶ luminesstsentsi ühikut (LU) sisaldav antigeenide kokteil (IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 1, IFN- α 21) või üksik antigeen ning inkubeeriti toatemperatuuril loksutil üks tund. Plaati pesti vaakumsüsteemi (Millipore, Saksamaa) abil neli korda puhvriga ning neli korda 1xPBS-ga (*phosphate buffered saline*). Filterplaadi igasse kannu lisati 20 μl lutsiferaasi substraati (1:1000 lahjendus) (Promega, USA) ning mõõdeti luminesstsentsi intensiivsus *VICTOR X Multilabel Plate Reader*'ga (PerkinElmer Life Sciences, USA). Positiivse kontrollina kasutati inimese IFN- α spetsiifilist monoklonaalset antikeha (19D11, Meyer *et al.*, 2016) kontsentratsioonis 10 ng/ μl . Uuritavate proovide väärtused avaldati suhteliste ühikutena (AU), mis arvutati kui protsent positiivsest kontrollist.

2.2.2.2 SLE vereseerumi IFN- α vastaste immunoglobuliin IgG alaklasside detekteerimine

Autoantikehade isotüüpide detekteerimiseks segati 1,5 ml tuubi kokku patsientide ja kontrollisikute 1:10 vereseerumi lahjendused, millele lisati juurde 10⁶ luminesstsentsi ühikut sisaldav antigeenide kokteil (IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 1, IFN- α 21). Lahuseid inkubeeriti toatemperatuuril segajal kaks tundi, seejärel üleöö +4°C juures. Järgmisel päeval pipeteeriti 96-kannulisele filterplaadile (Merck Millipore, Saksamaa) 25 μl streptavidiiniga seotud agaroskerade suspensiooni (Novagen, USA), millele lisati juurde 10 μl inimese IgG subtüübi spetsiifilisi biotinüleeritud antikehasid (anti-IgG₁, anti-IgG₂, anti-IgG₄ pärinesid BD Pharmingen, USA; anti-IgG₃ pärines Sigma-Aldrich, USA) ning inkubeeriti toatemperatuuril loksutil üks tund. Seejärel pipeteeriti üleöö inkubeerinud lahused filterplaadile laiali ja inkubeeriti toatemperatuuril loksutil kaks tundi. Plaati pesti vaakumsüsteemi abil neli korda puhvriga ja neli korda 1xPBS-ga. Filterplaadi igasse kannu lisati 20 μl lutsiferaasi substraati (1:1000 lahjendus) ning mõõdeti luminesstsentsi intensiivsus nagu eelnevalt kirjeldatud.

2.2.3 SLE patsientide vereseerumi neutraliseerimisvõime testimine

Inimese vereseerumis esinevate IFN- α 2a, IFN- α 5, IFN- α 6 ja IFN- α 8 vastaste autoantikehade neutraliseerimisvõime määramiseks kasutati HEK-Blue IFN- α / β rakuliini (InvivoGen, USA), mis indutseerib IFN- α -ga stimuleerimisel aluselise fosfataasi (AP) tootmise ISG54 promooteri alt, mida on võimalik detekteerida QUANTI-Blue ensüümiga (InvivoGen, USA).

Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel DMEM söötmes (Lonza, Šveits), millele oli lisatud 56°C inaktiveeritud FBS seerum ning antibiootikumid blastitsidiin 30 g/ml (InvivoGen, USA) ja zeotsiin 100 g/ml (InvivoGen, USA). IFN- α 2a kasutati kontsentratsioonil 25 U/ml (Miltenyi Biotec, Saksamaa). IFN- α 5, IFN- α 6 ja IFN- α 8 lutsiferaasi konjugaatide optimaalse kontsentratsiooni leidmiseks tehti seerialahjendus – edasisteks katseteks valiti lahjendused, mille aluselise fosfataasi kontsentratsioon oli lähedane IFN- α 2a 25 U/ml AP kontsentratsioonile.

96-kannulisel mikrotiiterplaadil (BD Bioscience, USA) tehti patsientide vereseerumite lahjendusread DMEM söötmes alglahjendusega 1:10, millele lisati juurde 50 μ l IFN- α lahjendust ning inkubeeriti kaks tundi koekultuurikapis (37°C, 5% CO₂). Positiivsesse kontrolli lisati patsientide vereseerumi lahjenduse asemel 50 μ l DMEM söödet ning negatiivsesse kontrolli lisati 100 μ l söödet. Peale inkubatsiooni pipeteeriti mikrotiiterplaadi igasse kannu 10⁵ IFN- α -HEK-Blue rakuliini rakku ning inkubeeriti üleöö koekultuurikapis. QUANTI-Blue pulber lahustati destilleeritud vees lõppmahuga 100 ml ning filtreeriti läbi 0,45 μ m filtri. Järgmisel päeval pipeteeriti 96-kannulisele läbipaistvale plaadile igasse kannu 180 μ l QUANTI-Blue substraati, soojendati 37°C kapis 10 minutit. Seejärel pipeteeriti plaadile üleöö seisnud stimuleeritud rakkude supernatant ning inkubeeriti 30 minutit 37°C kapis. Teostati optilise tiheduse mõõtmine 620 nm juures Multiscan MCC/340 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) lugejaga (Labsystems, USA). Neutraliseerimise aktiivsus väljendati IC50 väärtusena, mis näitab seerumi lahjendust, mille korral reageeriva IFN aktiivsus vähenes poole võrra.

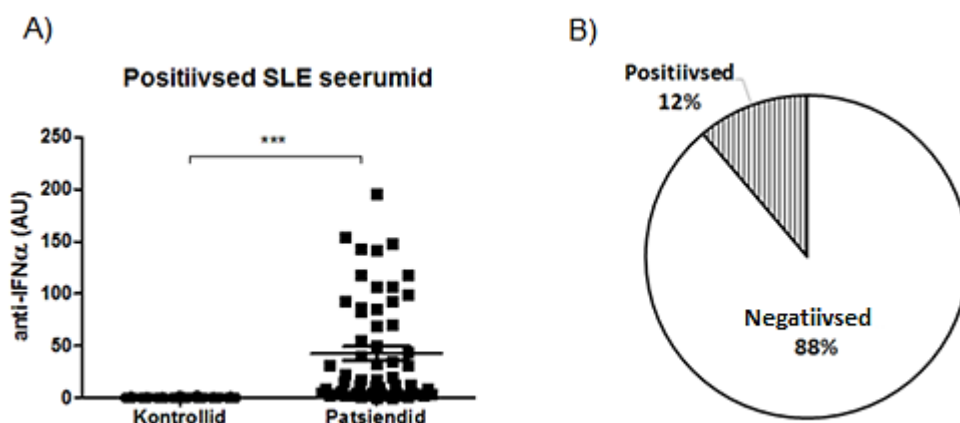
2.2.4 Statistiline analüüs

Tulemuste visualiseerimiseks ja analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA) programmi. Tulemuste võrdlemiseks kasutati erinevaid t-statistikuid, korrelatsiooni ning statistiliselt oluliseks loeti erinevused, mille $P < 0,05$. Graafikutele on lisatud gruppide keskmine ja standardviga (SEM).

2.3 Tulemused

2.3.1 Autoantikehade esinemissagedus SLE patsientidel

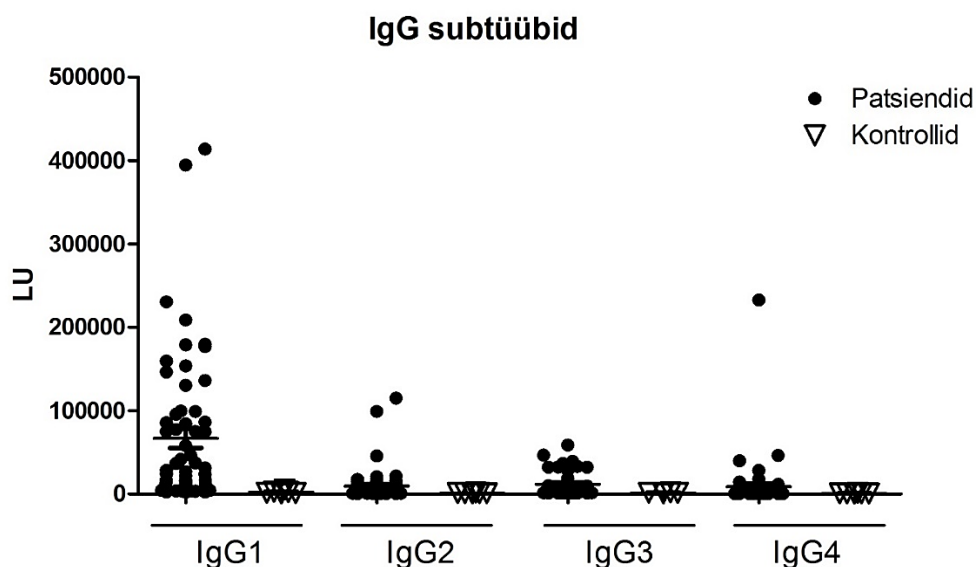
Esmalt skriinisime IFN- α vastast reaktiivsust erinevate IFN- α subtüüpide seguga. Positiivsete ja negatiivsete väärtuste piir arvutati tervetelt isikutelt pärinevate seerumite alusel (tervete kontrollide keskmine + kolm standardhälvet). 476-st SLE patsiendist oli 12% positiivseid ehk väärtusega üle seatud eristustlāve (Joonis 7B). Kontrollide autoantikehade tase oli märgatavalt madalam võrreldes patsientide tasemega (Joonis 7A).



Joonis 7. Anti-IFN α positiivsete SLE patsientide osakaal. SLE patsientidel määrati LIPS analüüsiga IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 1, IFN- α 21 tsütokiinide vastaste autoantikehade tase (AU) (A) ja esinemissagedus (B). Kontrollide ja patsientide vaheline erinevus on arvutatud Paaritu t-testiga (*Unpaired t-test*), kus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.3.2 SLE patsientidel domineerivad IgG1 alaklassi kuuluvad IFN- α vastased autoantikehad

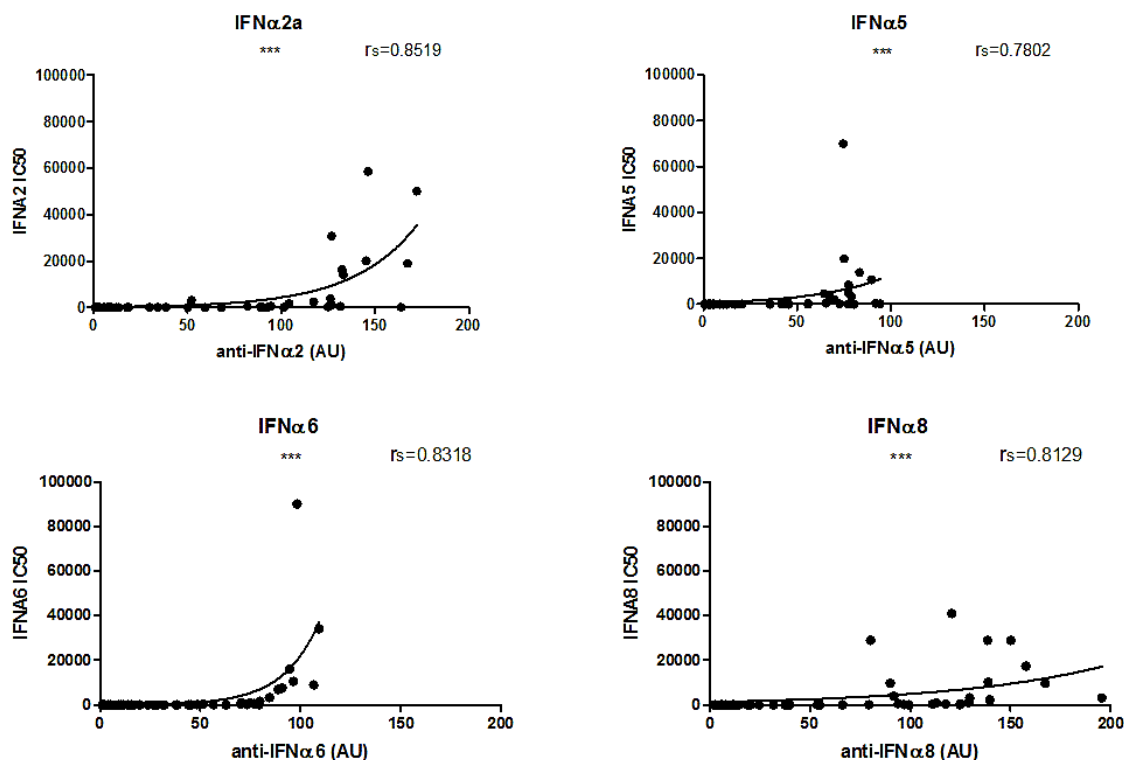
SLE patsientide ja kontrollgrupi IgG subtüüpide jaotuvust hinnati LIPS analüüsi tulemusel kasutades antigeenidena IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 1, IFN- α 21 kokteili (Joonis 8). SLE patsientide ja kontrollgruppide vaheliste tulemuste võrdlemiseks kasutati Welch'i t-testi. Kõikide alaklasside puhul esines patsientide ning kontrollgrupi vahel statistiliselt oluline erinevus ($P < 0,001$). Võrreldes patsientide IgG alaklasside tasemeid omavahel ühesuunalise dispersioonanalüüsiga selgus, et patsientide seas on domineerivaks IgG1 alaklass, mille väärtused olid märkimisväärselt kõrgemad võrreldes teiste alaklassidega. Eristus üks patsient, kellel domineeris tugevasti IgG4 alaklass.



Joonis 8. IgG alaklasside jaotuvus SLE patsientide hulgas. Graafikul on näidatud IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4 subtüübi IFN- α vastaste autoantikehade taset SLE patsientide ning kontrollide hulgas. LU – Luminestentsentsi ühik.

2.3.3 SLE patsientidel esinevad IFN- α vastased autoantikehad omavad neutraliseerimisvõimet

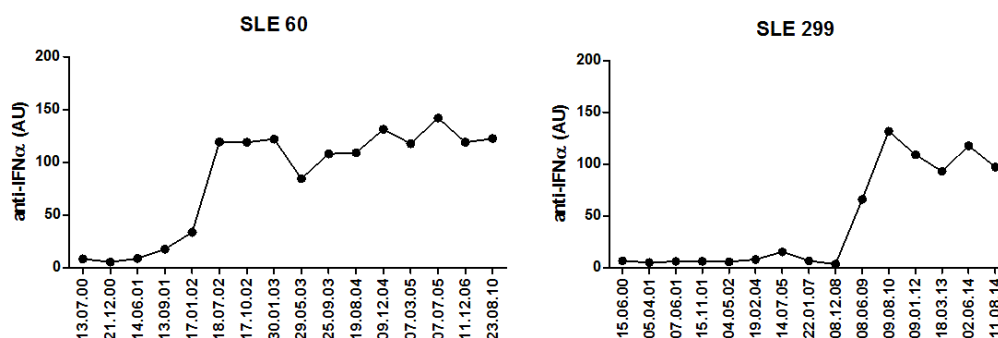
SLE patsientide seerumites esinevate autoantikehade võimet neutraliseerida IFN- α 2a, IFN- α 5, IFN- α 6 ja IFN- α 8 tsütokiinide bioloogilist aktiivsust testiti kasutades spetsiaalset rakuliini. Umbes pooltel antikehade suhtes positiivsetel patsientidel põhjustasid seerumis esinevad IFN- α vastased autoantikehad muutusi tsütokiinide bioloogilises funktsioonis (Joonis 9). Hinnates anti-IFN α autoantikehade taset ja neutraliseerimise tiitreid selgus, et need on omavahel positiivses korrelatsioonis. Mida kõrgem on autoantikehade tase patsientide seerumis, seda suurem on ka nende võime neutraliseerida tsütokiinide bioaktiivsust. Kõikide tsütokiinide puhul esines autoantikehade taseme ja neutraliseerimise tiitrite vahel statistiliselt oluline korrelatsioon.

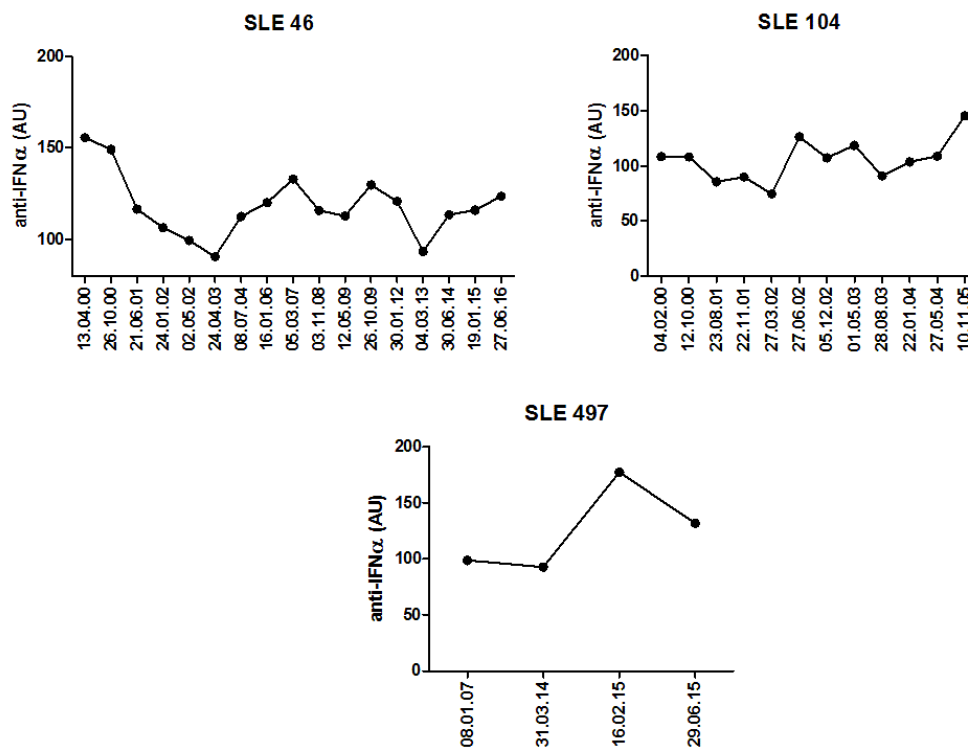


Joonis 9. Anti-IFNα vastaste antikehade tase on positiivses korrelatsioonis neutraliseerimise tiitritega. Graafikul on näidatud IFN-α2a, IFN-α5, IFN-α6 ja IFN-α8 vastaste autoantikehade taseme (AU) seos nende neutraliseerimise tiitritega. Neutraliseerimise tiitrid on tähistatud IC50, mis tähistab punkti, kus pool tsütokiini bioloogilisest aktiivsusest on inhibeeritud. Arvutatud on Spearman korrelatsioon, kus ***p < 0,001.

2.3.4 Autoantikehade tasemed püsivad peale teket haiguse jooksul stabiilsena

60-st anti-IFNα positiivsest SLE patsiendist uuriti edasi viite patsienti dünaamiliselt (Joonis 10). Kahel patsiendil viiest tekkisid autoantikehad jälgimisperioodi jooksul (SLE 60 ja SLE 299). Peale autoantikehade teket teatud ajapunktis, jäävad nende tasemed edaspidi suhteliselt stabiilselt püsima. Ülejäänud kolme patsiendi korral, SLE 46, 104, 497, on autoantikehade tase kõrge esimesest ajapunktist alates.

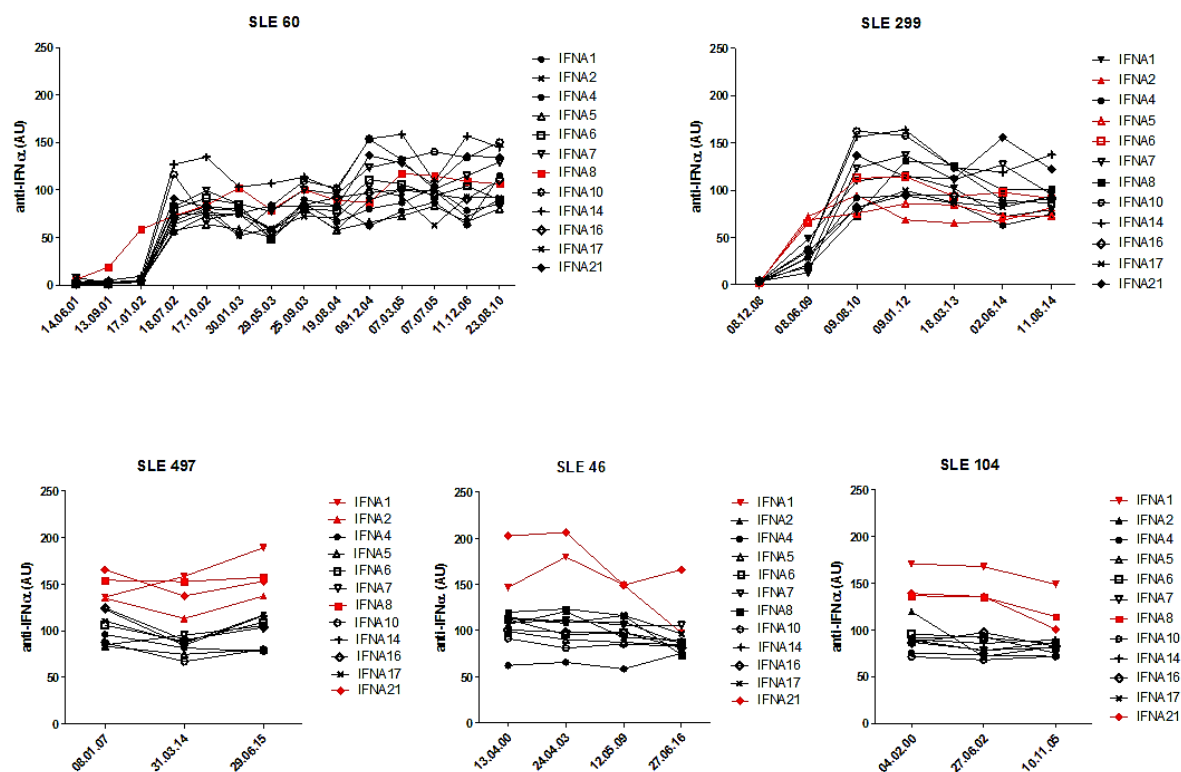




Joonis 10. Autoantikehade dünaamika jälgimine. LIPS analüüsiga mõõdeti IFN- α (IFN- α 2, IFN- α 8, IFN- α 1, IFN- α 21 segu) vastaste autoantikehade tase (AU) viiel SLE patsiendil.

2.3.5 Milline IFN- α subtüüp on SLE patsientidel esimeseks autoantikehade märklauaks?

Viie jälgitud patsiendi seerumist määrati 12 IFN- α subtüübi vastaste autoantikehade tasemed - SLE 60 patsiendil on selgelt eristatav, kuidas IFN- α 8 vastane reaktiivsus tekib kõige esimesena ning teiste subtüüpide vastaste autoantikehade tase tõuseb alles mitme kuu pärast. SLE 299 patsiendi puhul tekivad IFN- α 2, IFN- α 5 ja IFN- α 6 vastased autoantikehad teistest pisut varem. SLE patsientide 46, 104 ja 497 korral on IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 8 ja IFN- α 21 vastaste antikehade tasemed kõrgemad võrreldes teiste subtüüpidega (Joonis 11).

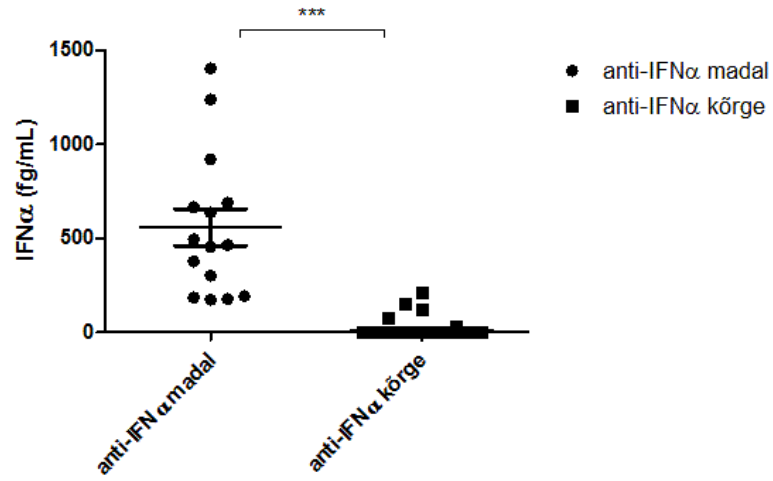


Joonis 11. IFN- α subtüüpide vastaste autoantikehade dünaamika ajas SLE patsientide hulgas. LIPS analüüsiga mõõdeti autoantikehade tase (AU) 12 IFN- α subtüübi vastu erinevatel ajapunktidel. Punasega on tähistatud IFN- α subtüübid, mille vastaste autoantikehade tase on teiste subtüüpidega võrreldes kõrgem või teke varajasem.

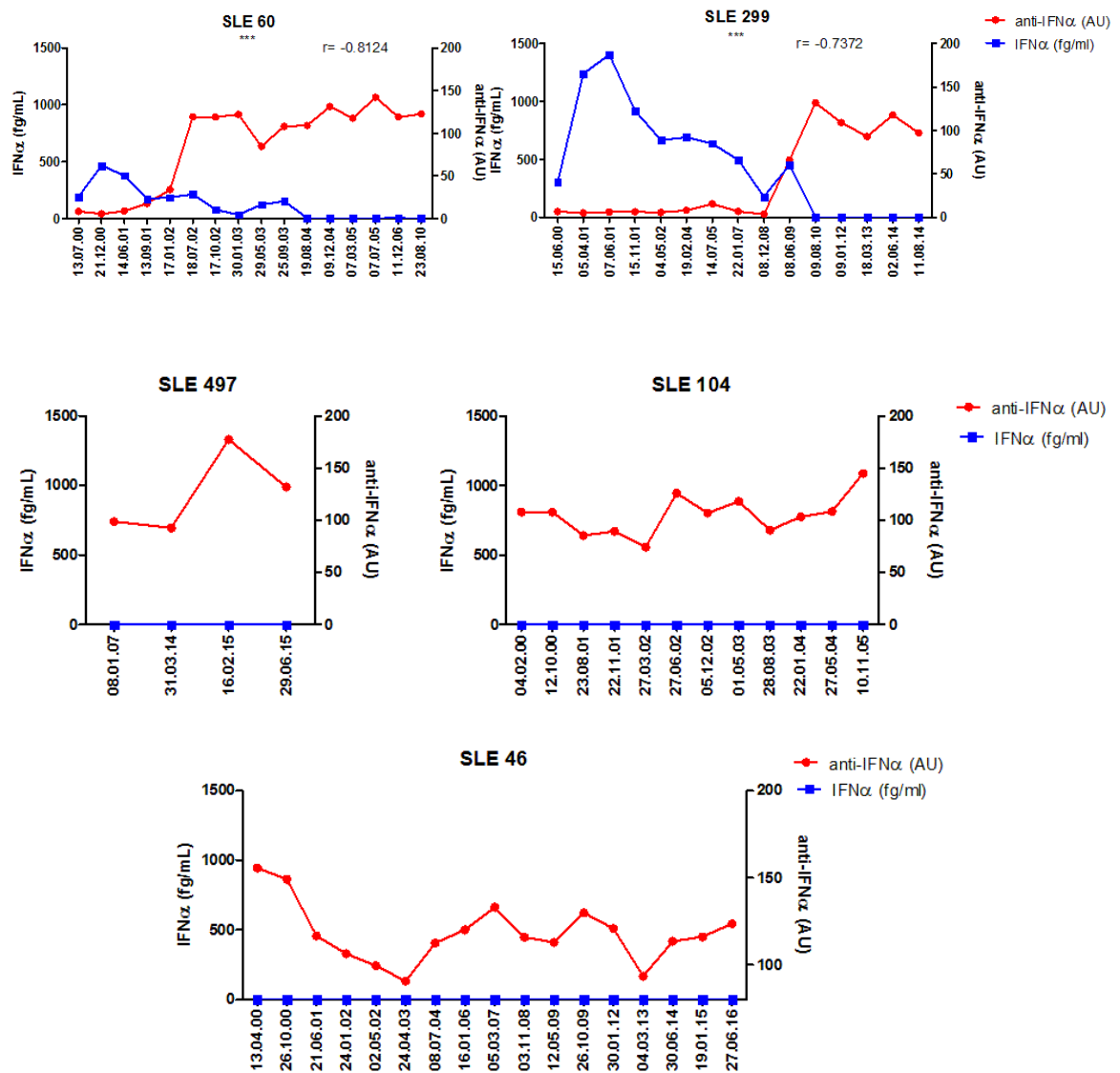
2.3.6 IFN- α kontsentratsioon on negatiivses korrelatsioonis anti-IFN α autoantikehade tasemega

Järgnevalt analüüsiti, kas võiks esineda seos IFN- α kontsentratsiooni ja anti-IFN α autoantikehade taseme vahel. Koostöös Pariisi Pasteuri instituudi uurimisgrupiga määrati anti-IFN α positiivsetel patsientidel IFN- α kontsentratsioon seerumis SiMoA meetodil (*Single Molecul Array*). LIPS analüüsi ja SiMoA meetodi tulemuste võrdlemise põhjal selgus, et IFN- α kontsentratsioon on negatiivses korrelatsioonis anti-IFN α autoantikehade tasemega (Joonis 12B). Mida kõrgem on anti-IFN α autoantikehade tase, seda madalam on IFN- α kontsentratsioon seerumis (Joonis 12A), mille põhjenduseks võib olla autoantikehade neutraliseeriv aktiivsus. Anti-IFN α autoantikehad neutraliseerivad IFN- α bioloogilise aktiivsuse, mille tulemusel langeb IFN- α kontsentratsioon. 436-st antikeha negatiivsest patsiendist kümnel oli IFN- α kontsentratsioon alla detektsiooni limiidi; antikeha positiivsetel patsientidel oli 59-st üheksal patsiendil IFN- α kontsentratsioon alla detektsiooni limiidi. Võrreldes kahte gruppi Hii-ruut testiga, saime statistiliselt olulise p-väärtuse ($p < 0,01$).

A)



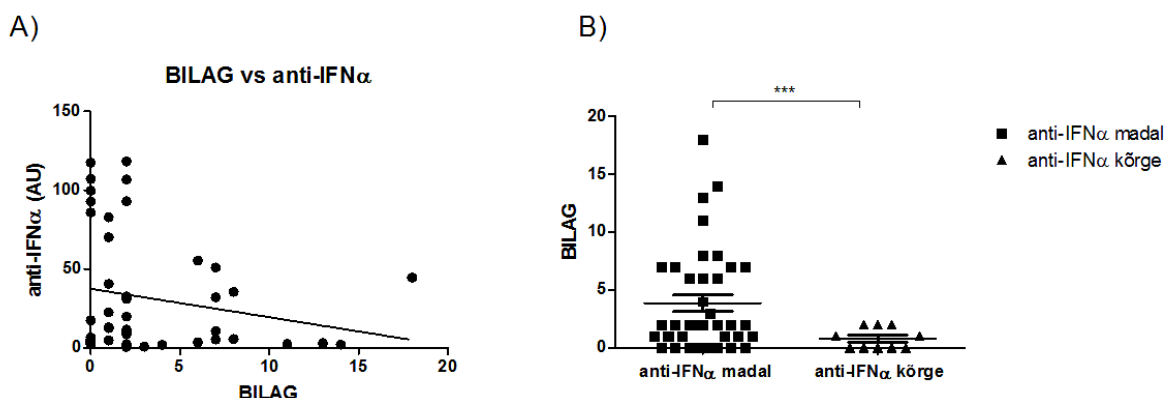
B)



Joonis 12. IFN- α kontsentratsiooni seos anti-IFN α autoantikehade tasemega. Joonisel A on näidatud IFN- α (fg/ml) kontsentratsiooni ja anti-IFN α (AU) taseme vaheline seos. Viie dünaamilise SLE patsiendi proovid on jaotatud kaheks grupiks: anti-IFN α madal (AU tase ≤ 70) ja anti-IFN α kõrge (AU tase > 70). Kahe grupi vaheline erinevus on arvutatud Paaritu t-testiga. B) IFN- α (fg/ml) tähistab IFN- α kontsentratsiooni (sinine joon) ja anti-IFN α (AU) tähistab autoantikehade taset (punane joon). SLE 60 ja SLE 299 patsientidel on arvutatud Pearsoni korrelatsioon, kus ***p < 0,001.

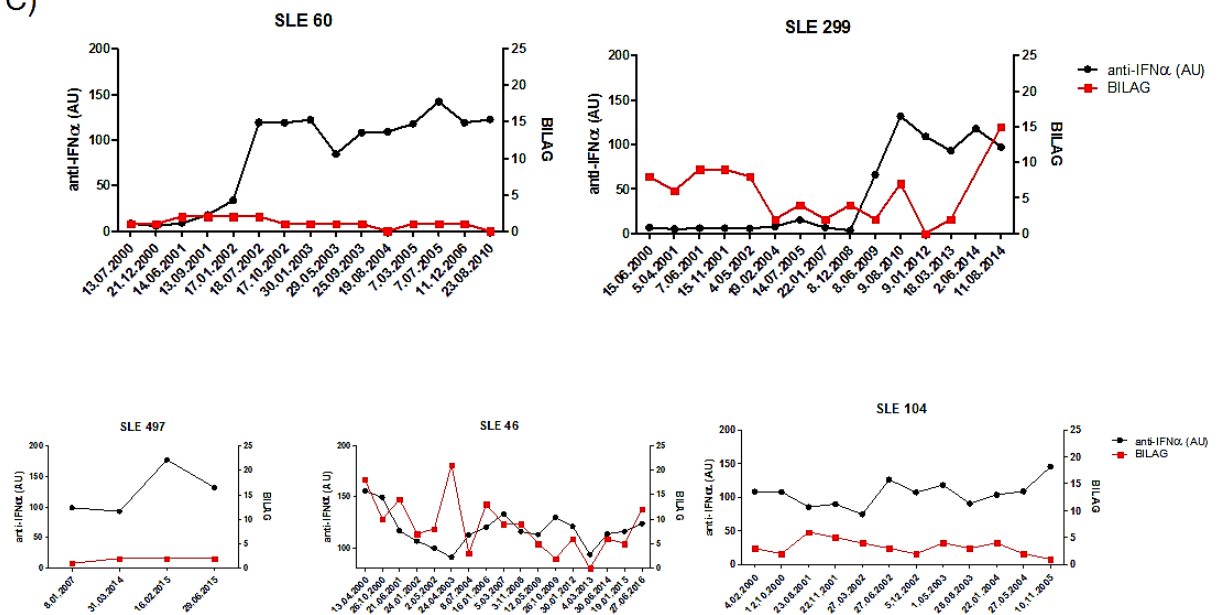
2.3.7 BILAG skoor on negatiivses korrelatsioonis IFN- α autoantikehade tasemega

Koostöös Londoni Ülikooli uurimisgrupiga saadi 60 positiivse ja viie longitudinaalse SLE patsiendi kliinilised andmed, mis sisaldasid infot BILAG (*British Isles Lupus Activity Group*) skoori kohta. Luupuse haiguse aktiivsuse hindamiseks kasutatakse BILAG skoori, mis on kasutusel ainult kliinilistes uuringutes. BILAG skoori arvutamiseks peavad patsiendid kõigepealt vastama 86-le organispetsiifilisele küsimusele, mille alusel hinnatakse sümptomeid skaalal 1 – 4 (1 – paranenud; 2 – sama; 3 – halvem; 4 – uus). Seejärel hinnatakse kõiki organsüsteeme ka laboratoorsete analüüside abil, mille tulemusel pannakse igale organile skoor A - E-ni (A – väga aktiivne haigus; B – keskmise aktiivsusega haigus; C – madala aktiivsusega haigus; D – paranenud haigus; E – haigusest puutumata organ). Nende küsimustike ja analüüside alusel arvutatakse igale patsiendile BILAG skoor.³ Mida kõrgem BILAG skoor, seda aktiivsem ning raskem on haigus. LIPS testi ja kliiniliste andmete analüüsil selgus, et BILAG skoor on negatiivses korrelatsioonis IFN- α autoantikehade tasemega (Joonis 13A). Seega, mida kõrgem on autoantikehade tase, seda madalam on nendel SLE patsientidel BILAG skoor (Joonis 13B ja 13C).



³ <https://www.lupusil.org/what-are-the-sledai-and-bilag-evaluations.html>

C)



Joonis 13. BILAG skoor on negatiivses korrelatsioonis autoantikehade tasemega. Joonisel A on näidatud BILAG skoori seos anti-IFN α antikehade tasemega (AU). Joonisel B on näidatud BILAG skoor 60 SLE patsiendil, kes on jagatud kaheks grupiks: anti-IFN α madal (AU tase ≤ 70) ja anti-IFN α kõrge (AU tase > 70). Statistiline erinevus on arvutatud Paaritu t-testiga, kus $***p < 0,001$. Joonisel C on näidatud BILAG skoori (punane joon) ja anti-IFN α tasemed (must joon) viiel longitudinaalsel SLE patsiendil.

2.4 Arutelu

Käesoleva magistritöö raames uuriti IFN- α vastaseid autoantikehasid SLE patsientidel. Anti-IFN α autoantikehasid on varasemalt leitud ka APECED ja tümoomiga patsientidel (Kärner *et al.*, 2013), RAG-mutatsioonidega patsientidel (Walter *et al.*, 2016), IPEX patsientidel (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) (Rosenberg *et al.*, 2018) ja ka monogeensete interferonopaatiate korral (Rice *et al.*, 2013). APECED patsientide puhul tekivad I tüüpi interferoonide vastased autoantikehad juba väga varajases eas ning püsivad patsientide vereseerumites pikaajaliselt, isegi kuni 30 aastat (Kärner *et al.*, 2013; Meager *et al.*, 2006; Meloni *et al.*, 2012; Tóth *et al.*, 2010). Tümoomiga patsientidel esinevad anti-IFN α /IL-12 autoantikehad ning nende järsk taseme tõus viitab kasvaja taastekkele (Meager *et al.*, 1997; Buckley *et al.*, 2001). Käesolevas uuringus leiti, et IFN- α vastaste autoantikehade esinemissagedus SLE patsientidel on 12% (Joonis 7B). See on väga sarnane Ching'i ja kolleegide poolt avaldatud tulemusele – 13% (Ching *et al.*, 2012), kuid kõrgem kui Gupta ja kolleegide poolt leitud sagedus – 6% (Gupta *et al.*, 2016). Erinevus detekteeritavate autoantikehade sageduses tuleneb ilmselt kasutatud meetoditest. Tsütokiinide vastaste autoantikehade tasemete mõõtmiseks on kasutatud ELISA testi (Meager *et al.*, 2006; Meloni *et al.*, 2008), multipleks analüüsi mikropartiklitel (Puel *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2016), euroopiumil-põhinevat immuunanalüüsi (Zhang *et al.*, 2007), *radioligand binding assay*'d (RLBA) (Ofstedal *et al.*, 2008), mikrokiipidel põhinevat analüüsi (Walter *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2018) ja LIPS analüüsi (Kärner *et al.*, 2013; Burbelo *et al.*, 2010; Ching *et al.*, 2012). Tsütokiinide puhul on peamised epitoobid konformatsioonilised, mitte lineaarsed (Kärner *et al.*, 2013) ning seetõttu on oluline, et tsütokiinid säilitaksid testsüsteemis oma loomuliku konformatsiooni. ELISA ja ka mikropartiklitel põhinevate meetodite korral seotakse antigeen tahkele pinnale, mille tagajärjel võivad epitoobid kaduma minna konformatsiooniliste muutuste kaudu (Kärner *et al.*, 2013). Tulenevalt sellest kasutati antud magistritöös autoantikehade tasemete määramiseks LIPS analüüsi, mille korral toimub antigeeni ja antikeha vaheline reaktsioon lahuses, mis tagab testi maksimaalse tundlikkuse konformatsiooniliste epitoopide säilumise tõttu (Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010; Burbelo *et al.*, 2010; Kisand & Peterson, 2015; Kärner *et al.*, 2013).

Tsütokiinide vastased autoantikehad võivad olla olulised tsütokiinide bioloogilise aktiivsuse neutraliseerimisel või vastupidiselt pikendades tsütokiinide poolestusaega. Näiteks APECED patsientidel esinevad IL-6 vastased autoantikehad, mis ei oma neutraliseerivat funktsiooni, vaid hoopis stabiliseerivad IL-6 poolestusaega FcRn (*Neonatal Fc receptor*) kaudu (Kärner *et al.*, 2016). Tsütokiinide neutraliseerimise tagajärjeks võib olla vastuvõtlikkuse tõus teatud

infektsioonitekitajate suhtes. Kuid on kirjeldatud ka tsütokiine neutraliseerivate autoantikehade kaitsvat toimet autoimmuunsete haiguste eest. Erialasest kirjandusest on teada, et I tüüpi interferoonid aitavad kaasa 1. tüüpi diabeedi kujunemisele (Downes *et al.*, 2010; Foulis *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1995; Carrero *et al.*, 2013). APECED patsientide hulgas, kellel esinesid IFN- α -t neutraliseerivad autoantikehad kõrges tiitris, avaldus ainult vähestel T1D; samas nendel, kelle esines madalas tiitris autoantikehad ning ei inhibeeritud I tüüpi interferoone, tekkis T1D (Kärner *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2016). SLE patsientidel osalevad samuti I tüüpi interferoonid haiguse etiopatogeneesis (Joonis 5), nimelt iseloomustab SLE patsiente I tüüpi interferoonide ületoodang. Antud magistritöös uurisime SLE patsientide IFN- α vastaste autoantikehade neutraliseerivat aktiivsust ning nägime, et pooltel positiivsetel patsientidel esinesid neutraliseerivad autoantikehad (Joonis 8). Vaadates patsientide kliinilisi andmeid selgus, et mida kõrgem oli anti-IFN α autoantikehade tase, seda madalam oli haiguse aktiivsus (Joonis 12). Sellest võib järeldada, et IFN- α -t neutraliseerivad autoantikehad võivad omada potentsiaalselt kaitsvat efekti SLE haiguse aktiivsusele.

Käesoleva magistritöö raames määrasime autoantikehade IgG subtüüpide jaotuvuse SLE patsientidel, kuna see võimaldab saada informatsiooni autoimmuniseerumise koha ja selles osalevate rakutüüpide kohta. APECED ja tümoomiga patsientide puhul on domineerivateks alaklassideks IgG1 ja IgG4, mis viitab autoimmuniseerumisele epiteliaalses koes (nahk, tüümus) või reguleerivate T-rakkude abile (Treg) (Kärner *et al.*, 2013). Antud magistritöö tulemused näitasid, et SLE patsientide puhul on tsütokiinide vastaste autoantikehade IgG domineerivaks alaklassiks IgG1 (Joonis 7). Enamus autoantigeene on valgulised ning B-raku aktiveerimiseks on vajalik Th rakkude abi, mille tulemusel toodetakse põhiliselt IgG1 alaklassi autoantikehasid (Zhang *et al.*, 2015; Schroeder *et al.*, 2010). Selle katse tulemusel võib järeldada, et IgG1 autoantikehad saavad abi Th1 rakkudelt, mis algatavad põletikulise vastuse ning võib oletada, et selle tulemusel hakatakse perifeerias liigselt ekspresseerima interferoone, mis viib autoantikehade tekkeni.

SLE patsiente iseloomustavad autoantikehad, mis ilmnevad juba enne haiguse kliinilist avaldumist. Nagu eelnevalt mainitud esineb tervetel inimestel autoreaktiivsete antikehade eemaldamiseks mitmeid kontrollpunkte: esimene kontrollpunkt toimub luuüdis ebaküpsete B-rakkude staadiumis ehk tsentraalse tolerantsuse tagamine; teine kontrollpunkt esineb perifeerias transitoorsete B-rakkude staadiumis ehk perifeerse tolerantsuse tagamine. Yurasov *et al.* on näidanud, kuidas SLE patsientidel esineb rohkelt autoreaktiivseid B-raku kloone juba transitoorsete B-rakkude staadiumis, mis viitab sellele, et tolerantsuses on tekkinud häired juba ebaküpsete B-rakkude staadiumis luuüdis (Yurasov *et al.*, 2005). Lisaks esineb paljudel SLE

patsientidel rohkelt autoreaktiivseid B-raku kloone ka küpsete naiivsete B-rakkude hulgas (Yurasov *et al.*, 2005). Taolised autoreaktiivsed B-raku kloonid ei pruugi algselt toota patogeenseid autoantikehasid, kuid teatud signaalide tulemusel võivad need saada edasise küpsemisignaali. SLE patsientidel on näidatud ülemäärast I tüüpi interferoonide produktsiooni, mille tulemusel stimuleeritakse pidevalt B- ja T-rakke, suunates autoreaktiivsed B-raku kloonid klonaalselt paljunema ja somaatilisse hüpermutatsiooni, tänu millele hakkavad need B-raku kloonid sekreteerima patogeenseid autoantikehasid (Radic *et al.*, 1993; Shlomchik *et al.*, 1987a; Shlomchik *et al.*, 1987b; Rönnblom, 2016). Lisaks tsütokiinidele võivad B- ja T-rakud saada stimulatsiooni ka nukleiinhapetelt, mis on apoptootilist päritolu. Sellised apoptootilist päritolu autoantigeenid omakorda aktiveerivad ka TLR retseptoreid, tekitades tugeva kostimulatsiooni, mis viib jällegi patogeensete autoantikehade tekkeni (Mevorach *et al.*, 1998; Leadbetter *et al.*, 2002; Viglianti *et al.*, 2003). SLE patsientidel esinevad häired nii tsentraalses kui ka perifeerses tolerantsuses, kuid praeguste andmete põhjal pole veel teada, millises punktis toimub esmane tolerantsuse kadumine.

KOKKUVÕTE

Tsütokiinide vastased autoantikehad iseloomustavad mitmeid autoimmuunhaigusi. Tsütokiinide vastased autoantikehad võivad omada nii kahjulikku kui ka potentsiaalselt kasulikku mõju autoimmuunhaiguste korral. Käesoleva magistritöö raames uuriti lähemalt SLE patsientidel esinevaid IFN- α vastaseid neutraliseerivaid autoantikehasid. SLE patsientidel esineb ülemäärane I tüüpi interferoonide produktsioon, mida peetakse SLE patogeneesis üheks olulisimaks faktoriks.

Käesoleva magistritöö käigus leiti, et 12% uuritavatest SLE patsientidest esinesid IFN- α vastased autoantikehad, mis kuulusid enamjaolt IgG1 alaklassi. Positiivsetest patsientidest pooltel esinesid neutraliseeriva aktiivsusega autoantikehad. Uurides viit SLE patsienti dünaamiliselt, leiti, et IFN- α vastaste autoantikehade tase tõuseb järsult teatud ajapunktis ning nende tasemed võivad püsida stabiilsed mitmete aastate jooksul. Kuigi IFN- α 8 ja teisel juhul IFN- α 2, IFN- α 5 ja IFN- α 6 vastased autoantikehad tekkisid üksikutel informatiivsetel juhtudel teistest subtüüpidest pisut varem, kujunes ristreaktiivsus kõigi subtüüpide suhtes mõne kuu jooksul. Hinnates SLE patsientide vereseerumi IFN- α kontsentratsiooni ja anti-IFN α antikehade taset, selgus, et mida kõrgem on IFN- α vastaste autoantikehade tase, seda madalam on IFN- α kontsentratsioon tänu autoantikehade neutraliseerivale aktiivsusele. Analüüsides SLE patsientide kliinilisi andmeid leidsime, et SLE patsientide haiguse aktiivsus on madalam kõrge anti-IFN α antikehade tiitri korral. Lisaks tõestati antud magistritöö raames LIPS analüüsi efektiivsust autoantikehade taseme määramisel.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva magistritöö tulemused, et SLE patsientidel võivad haiguse käigus tekkida neutraliseerivad IFN- α vastased autoantikehad ning need võivad omada potentsiaalselt kasulikku mõju SLE haiguse kulule. Lähtuvalt selle töö tulemustest tuleks jätkata SLE patsientide kliiniliste andmete analüüsi. Kasulik oleks võrrelda antikehade suhtes positiivseid ja negatiivseid patsiente omavahel IFN- α kontsentratsiooni ja BILAG skoori alusel.

Type I IFN neutralizing autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus

Liis Haljasmägi

SUMMARY

Autoantibodies against cytokines have been characterized in many autoimmune diseases. These autoantibodies are usually pathogenic, but in some cases they may have a beneficial effect to the diseases. The aim of this study was to investigate neutralizing autoantibodies against IFN- α in patients with SLE. Overproduction of type I interferons is one the hallmarks of SLE – type I interferons play central role in the etiopathogenesis of SLE. Excessive production of IFN- α results in formation of immune complexes containing nucleic acids that act as endogenous IFN- α inducers, causing prolonged IFN- α and autoantibody production.

In this study, we showed that 12% of SLE patients had autoantibodies against IFN- α , which were of IgG1 subclass. In half of the positive cases SLE patients had autoantibodies that neutralized IFN- α biological activity. When we investigated five patients dynamically, we saw that once anti-IFN α antibodies develop, they are present throughout the disease for many years. We showed that IFN- α 8 and IFN- α 2 were the first ones to come up and reactivity of other IFN- α subtypes developed within several months. We investigated IFN- α concentration in SLE patient serum samples and discovered that IFN- α concentration was decreased in patients with high anti-IFN α titers, which is possibly the result of neutralizing activity of these autoantibodies. Analysis of clinical data showed that disease activity was reduced in SLE patients with high titers of autoantibodies against IFN- α . Finally, we managed to show the efficiency of LIPS analysis for measuring autoantibodies.

In conclusion, the results of this study show that some patients with SLE develop IFN- α neutralizing autoantibodies which may modify the disease course of SLE. On the basis of this work, further investigation of clinical data of SLE patients would be helpful. For example, comparison of positive and negative patient's IFN- α concentration and BILAG score may give us further useful information about the role of type I interferons in patients with SLE.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajat Kai Kisand'i, kelle abil käesolev töö valmis. Samuti soovin tänada kaasjuhendajaid Pärt Peterson'i ja Lili Milani't. Suured tänusõnad ka kõigile teistele Molekulaarpatoloogia uurimisgrupi liikmetele nende toetuse ja abi eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

A) Ajakiri

Akkaraju, S., Canaan, K., and Goodnow, C.C. (1997). Self-reactive B cells are not eliminated or inactivated by autoantigen expressed on thyroid epithelial cells. *J. Exp. Med.* 186: 2005–2012.

Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M. V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A., and Harley, J.B. (2003). Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 349: 1526–1533.

Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. *Immunity* 25: 383–392.

Bernasconi, N.L., Onai, N., and Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101: 4500–4504.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286: 1735–1738.

Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., and Mantovani, A. (2003). The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102: 956–963.

Brink, R. (2014). The imperfect control of self-reactive germinal center B cells. *Curr. Opin. Immunol.* 28: 97–101.

Brink, R., and Phan, T.G. (2018). Self-Reactive B Cells in the Germinal Center Reaction. *Annu. Rev. Immunol.* 36: annurev-immunol-051116-052510.

Buckley, C., Newsom-Davis, J., Willcox, N., and Vincent, A. (2001). Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence? *Neurology* 57: 1579–1582.

Burbelo, P.D., Browne, S.K., Sampaio, E.P., Giaccone, G., Zaman, R., Kristosturyan, E., Rajan, A., Ding, L., Ching, K.H., Berman, A., *et al.* (2010). Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia. *Blood* 116: 4848–4858.

Burnett, D.L., Langley, D.B., Schofield, P., Hermes, J.R., Chan, T.D., Jackson, J., Bourne, K., Reed, J.H., Patterson, K., Porebski, B.T., *et al.* (2018). Germinal center antibody mutation trajectories are determined by rapid self/foreign discrimination. *Science* (80-.). 360: 223–226.

Buyon, J.P., and Winchester, R. (1990). Congenital complete heart block. A human model of passively acquired autoimmune injury. *Arthritis Rheum.* 33: 609–614.

Cappellano, G., Orilieri, E., Woldetsadik, A.D., Boggio, E., Soluri, M.F., Comi, C., Sblattero, D., Chiocchetti, A., and Dianzani, U. (2012). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 1: 136–146.

Carrero, J.A., Calderon, B., Towfic, F., Artyomov, M.N., and Unanue, E.R. (2013). Defining the Transcriptional and Cellular Landscape of Type 1 Diabetes in the NOD Mouse. *PLoS One* 8: e59701.

- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 179: 1317–1330.
- Castro, C., and Gourley, M. (2010). Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: S238–47.
- Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., and Brink, R. (2009). Antigen Affinity Controls Rapid T-Dependent Antibody Production by Driving the Expansion Rather than the Differentiation or Extrafollicular Migration of Early Plasmablasts. *J. Immunol.* 183: 3139–3149.
- Chan, T.D., Wood, K., Hermes, J.R., Butt, D., Jolly, C.J., Basten, A., and Brink, R. (2012). Elimination of germinal-center-derived self-reactive B cells is governed by the location and concentration of self-antigen. *Immunity* 37: 893–904.
- Charles, E.D., Orloff, M.I.M., Nishiuchi, E., Marukian, S., Rice, C.M., and Dustin, L.B. (2013). Somatic hypermutations confer rheumatoid factor activity in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum.* 65: 2430–2440.
- Chazenbalk, G.D., Pichurin, P., Chen, C.-R., Latrofa, F., Johnstone, A.P., McLachlan, S.M., and Rapoport, B. (2002). Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J. Clin. Invest.* 110: 209–217.
- Chen, J., Baig, E., and Fish, E.N. (2004). Diversity and Relatedness Among the Type I Interferons. *J. Interf. Cytokine Res.* 24: 687–698.
- Chi, C.-Y., Chu, C.-C., Liu, J.-P., Lin, C.-H., Ho, M.-W., Lo, W.-J., Lin, P.-C., Chen, H.-J., Chou, C.-H., Feng, J.-Y., *et al.* (2013). Anti-IFN- autoantibodies in adults with disseminated nontuberculous mycobacterial infections are associated with HLA-DRB1*16:02 and HLA-DQB1*05:02 and the reactivation of latent varicella-zoster virus infection. *Blood* 121: 1357–1366.
- Ching, K.H., Burbelo, P.D., Tipton, C., Wei, C., Petri, M., Sanz, I., and Iadarola, M.J. (2012). Two Major Autoantibody Clusters in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One* 7: e32001.
- Cho, M.J., Lo, A.S.Y., Mao, X., Nagler, A.R., Ellebrecht, C.T., Mukherjee, E.M., Hammers, C.M., Choi, E.-J., Sharma, P.M., Uduman, M., *et al.* (2014). Shared VH1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients. *Nat. Commun.* 5: 4167.
- Cooke, M.P., Heath, A.W., Shokat, K.M., Zeng, Y., Finkelman, F.D., Linsley, P.S., Howard, M., and Goodnow, C.C. (1994). Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells. *J. Exp. Med.* 179: 425–438.
- Costenbader, K.H., Kim, D.J., Peerzada, J., Lockman, S., Nobles-Knight, D., Petri, M., and Karlson, E.W. (2004). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 50: 849–857.
- Courtney, L.P., Phelps, J.L., and Karavodin, L.M. (1994). An anti-IL-2 antibody increases serum half-life and improves anti-tumor efficacy of human recombinant interleukin-2. *Immunopharmacology* 28: 223–232.
- Czaja, C.A., Merkel, P.A., Chan, E.D., Lenz, L.L., Wolf, M.L., Alam, R., Frankel, S.K.,

- Fischer, A., Gogate, S., Perez-Velez, C.M., *et al.* (2014). Rituximab as Successful Adjunct Treatment in a Patient With Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection Due to Acquired Anti-Interferon- Autoantibody. *Clin. Infect. Dis.* 58: e115–e118.
- Dieker, J.W., Fransen, J.H., van Bavel, C.C., Briand, J.-P., Jacobs, C.W., Muller, S., Berden, J.H., and van der Vlag, J. (2007). Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 56: 1921–1933.
- Downes, K., Pekalski, M., Angus, K.L., Hardy, M., Nutland, S., Smyth, D.J., Walker, N.M., Wallace, C., and Todd, J.A. (2010). Reduced Expression of IFIH1 Is Protective for Type 1 Diabetes. *PLoS One* 5: e12646.
- Drachman, D.B., Adams, R.N., and Stanley, E.F. (1980). Mechanisms of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43: 601–610.
- Dwivedi, N., and Radic, M. (2014). Citrullination of autoantigens implicates NETosis in the induction of autoimmunity. *Ann. Rheum. Dis.* 73: 483–491.
- Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T.L., Aderem, A., and Ravetch, J. V. (2006). TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J. Exp. Med.* 203: 553–561.
- Elkarim, R.A., Mustafa, M., Kivisäkk, P., Link, H., and Bakhiet, M. (1998). Cytokine autoantibodies in multiple sclerosis, aseptic meningitis and stroke. *Eur. J. Clin. Invest.* 28: 295–299.
- Elkon, K., and Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4: 491–498.
- Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D.M., and Strasser, A. (2003). Loss of the Pro-Apoptotic BH3-only Bcl-2 Family Member Bim Inhibits BCR Stimulation–induced Apoptosis and Deletion of Autoreactive B Cells. *J. Exp. Med.* 198: 1119–1126.
- Eris, J.M., Basten, A., Brink, R., Doherty, K., Kehry, M.R., and Hodgkin, P.D. (1994). Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4392–4396.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 935–946.
- Fishman, D., Kisand, K., Hertel, C., Rothe, M., Remm, A., Pihlap, M., Adler, P., Vilo, J., Peet, A., Meloni, A., *et al.* (2017). Autoantibody Repertoire in APECED Patients Targets Two Distinct Subgroups of Proteins. *Front. Immunol.* 8: 976.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J., and Singh, S. (2008). Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19: 3–19.
- Fomsgaard, A., Svenson, M., and Bendtzen, K. (1989). Auto-antibodies to tumour necrosis factor alpha in healthy humans and patients with inflammatory diseases and gram-negative bacterial infections. *Scand. J. Immunol.* 30: 219–223.
- Foulis, A., Farquharson, M., and Meager, A. (1987). Immunoreactive α -interferon in insulin-secreting β cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 330: 1423–1427.

- Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG Proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends, and Transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 495–527.
- Garrone, P., Neidhardt, E.M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C., and Banchereau, J. (1995). Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182: 1265–1273.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., and Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 177: 999–1008.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.* 178: 7779–7786.
- Glauzy, S., Sng, J., Bannock, J.M., Gottenberg, J.-E., Korganow, A.-S., Cacoub, P., Saadoun, D., and Meffre, E. (2017). Brief Report: Defective Early B Cell Tolerance Checkpoints in Sjögren's Syndrome Patients. *Arthritis Rheumatol.* 69: 2203–2208.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., *et al.* (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334: 676–682.
- Graudal, N.A., Svenson, M., Tarp, U., Garred, P., Jurik, A.-G., and Bendtzen, K. (2002). Autoantibodies against interleukin 1alpha in rheumatoid arthritis: association with long term radiographic outcome. *Ann. Rheum. Dis.* 61: 598–602.
- Groom, J.R., Fletcher, C.A., Walters, S.N., Grey, S.T., Watt, S. V., Sweet, M.J., Smyth, M.J., Mackay, C.R., and Mackay, F. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J. Exp. Med.* 204: 1959–1971.
- Gupta, S., Tatouli, I.P., Rosen, L.B., Hasni, S., Alevizos, I., Manna, Z.G., Rivera, J., Jiang, C., Siegel, R.M., Holland, S.M., *et al.* (2016). Distinct Functions of Autoantibodies Against Interferon in Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Analysis of Anticytokine Autoantibodies in Common Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol.* (Hoboken, N.J.) 68: 1677–1687.
- Hansen, M.B., Svenson, M., Diamant, M., and Bendtzen, K. (1991). Anti-interleukin-6 antibodies in normal human serum. *Scand. J. Immunol.* 33: 777–781.
- Hansen, M.B., Andersen, V., Rohde, K., Florescu, A., Ross, C., Svenson, M., and Bendtzen, K. (1995). Cytokine autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 24: 197–203.
- Hartley, S.B., Cooke, M.P., Fulcher, D.A., Harris, A.W., Cory, S., Basten, A., and Goodnow, C.C. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72: 325–335.
- Herlands, R.A., Christensen, S.R., Sweet, R.A., Hershberg, U., and Shlomchik, M.J. (2008). T Cell-Independent and Toll-like Receptor-Dependent Antigen-Driven Activation of Autoreactive B Cells. *Immunity* 29: 249–260.
- Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40: 1725.
- Hooks, J.J., Moutsopoulos, H.M., Geis, S.A., Stahl, N.I., Decker, J.L., and Notkins, A.L.

- (1979). Immune Interferon in the Circulation of Patients with Autoimmune Disease. *N. Engl. J. Med.* 301: 5–8.
- Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, A., James, R.F., Lernmark, A., Pujol-Borrell, R., Rabinovitch, A., Somoza, N., and Stewart, T.A. (1995). Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44: 658–664.
- Isenberg, D.A., Manson, J.J., Ehrenstein, M.R., and Rahman, A. (2007). Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology* 46: 1052–1056.
- Jouvenne, P., Fossiez, F., Banchereau, J., and Miossec, P. (1997). High levels of neutralizing autoantibodies against IL-1 alpha are associated with a better prognosis in chronic polyarthritis: a follow-up study. *Scand. J. Immunol.* 46: 413–418.
- Kärner, J., Meager, A., Laan, M., Maslovskaja, J., Pihlap, M., Remm, A., Juronen, E., Wolff, A.S.B., Husebye, E.S., Podkrajšek, K.T., *et al.* (2013). Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice. *Clin. Exp. Immunol.* 171: 263–272.
- Kärner, J., Pihlap, M., Ranki, A., Krohn, K., Trebusak Podkrajsek, K., Bratanic, N., Battelino, T., Willcox, N., Peterson, P., and Kisand, K. (2016). IL-6-specific autoantibodies among APECED and thymoma patients. *Immunity, Inflamm. Dis.* 4: 235–243.
- Kisand, K., and Peterson, P. (2015). Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy. *J. Clin. Immunol.* 35: 463–478.
- Kisand, K., Bøe Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V, Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., *et al.* (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 207: 299–308.
- Knight, V., Merkel, P., and O'Sullivan, M. (2016). Anticytokine Autoantibodies: Association with Infection and Immune Dysregulation. *Antibodies* 5: 3.
- Kuhn, K.A., Kulik, L., Tomooka, B., Braschler, K.J., Arend, W.P., Robinson, W.H., and Holers, V.M. (2006). Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.* 116: 961–973.
- Kulmala, P., Savola, K., Petersen, J.S., Vähäsalo, P., Karjalainen, J., Löppönen, T., Dyrberg, T., Akerblom, H.K., and Knip, M. (1998). Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J. Clin. Invest.* 101: 327–336.
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin–IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603–607.
- Leslie, D., Lipsky, P., and Notkins, A.L. (2001). Autoantibodies as predictors of disease. *J. Clin. Invest.* 108: 1417–1422.
- Leslie, R.D.G., Atkinson, M.A., and Notkins, A.L. (1999). Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 42: 3–14.
- Liu, Y.-J., Arpin, C., de Bouteiller, O., Guret, C., Banchereau, J., Martinez-Valdez, H., and Lebecque, S. (1996). Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development. *Semin. Immunol.* 8: 169–177.

- Liu, Y.J., Barthélémy, C., de Bouteiller, O., Arpin, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1995). Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* 2: 239–248.
- Meager, A., and Wadhwa, M. (2014). Detection of anti-cytokine antibodies and their clinical relevance. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10: 1029–1047.
- Meager, A., Vincent, A., Newsom-Davis, J., and Willcox, N. (1997). Spontaneous neutralising antibodies to interferon--alpha and interleukin-12 in thymoma-associated autoimmune disease. *Lancet* (London, England) 350: 1596–1597.
- Meager, A., Visvalingam, K., Peterson, P., Möll, K., Murumägi, A., Krohn, K., Eskelin, P., Perheentupa, J., Husebye, E., Kadota, Y., *et al.* (2006). Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3: e289.
- Meloni, A., Furcas, M., Cetani, F., Marcocci, C., Falorni, A., Perniola, R., Pura, M., Bøe Wolff, A.S., Husebye, E.S., Lilic, D., *et al.* (2008). Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 4389–4397.
- Meloni, A., Willcox, N., Meager, A., Atzeni, M., Wolff, A.S.B., Husebye, E.S., Furcas, M., Rosatelli, M.C., Cao, A., and Congia, M. (2012). Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1: An Extensive Longitudinal Study in Sardinian Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 1114–1124.
- Mevorach, D., Zhou, J.L., Song, X., and Elkon, K.B. (1998). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med.* 188: 387–392.
- Meyer-Bahlburg, A., Khim, S., and Rawlings, D.J. (2007). B cell–intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J. Exp. Med.* 204: 3095–3101.
- Meyer, S., Woodward, M., Hertel, C., Vlaicu, P., Haque, Y., Kärner, J., Macagno, A., Onuoha, S.C., Fishman, D., Peterson, H., *et al.* (2016). AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell* 166: 582–595.
- Möttönen, T., Paimela, L., Leirisalo-Repo, M., Kautiainen, H., Ilonen, J., and Hannonen, P. (1998). Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with ‘sawtooth’ strategy. *Ann. Rheum. Dis.* 57: 533–539.
- Nemazee, D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 728–740.
- Nemazee, D.A., and Bürki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337: 562–566.
- Niewold, T.B., Clark, D.N., Salloum, R., and Poole, B.D. (2010). Interferon alpha in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 948364.
- Nishimura, T., Fujita-Suzuki, Y., Yonemaru, M., Ohkusu, K., Sakagami, T., Carpenter, S.M., Otsuka, Y., Namkoong, H., Yano, I., and Hasegawa, N. (2015). Recurrence of disseminated Mycobacterium avium complex disease in a patient with anti-gamma interferon autoantibodies by reinfection. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1436–1438.
- Oftedal, B.E., Bøe Wolff, A.S., Bratland, E., Kämpe, O., Perheentupa, J., Myhre, A.G., Meager, A., Purushothaman, R., Ten, S., and Husebye, E.S. (2008). Radioimmunoassay for

autoantibodies against interferon omega; its use in the diagnosis of autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Clin. Immunol.* 129: 163–169.

Ota, T., Ota, M., Duong, B.H., Gavin, A.L., and Nemazee, D. (2011). Liver-expressed Igk superantigen induces tolerance of polyclonal B cells by clonal deletion not κ to λ receptor editing. *J. Exp. Med.* 208: 617–629.

Peichl, P., Pursch, E., Bröhl, H., and Lindley, I.J. (1999). Anti-IL-8 autoantibodies and complexes in rheumatoid arthritis: polyclonal activation in chronic synovial tissue inflammation. *Rheumatol. Int.* 18: 141–145.

Pereira, J.P., Kelly, L.M., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* 460: 1122–1126.

Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., *et al.* (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* 3: 767.

Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachée-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., *et al.* (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Exp. Med.* 207: 291–297.

Radic, M.Z., Mackle, J., Erikson, J., Mol, C., Anderson, W.F., and Weigert, M. (1993). Residues that mediate DNA binding of autoimmune antibodies. *J. Immunol.* 150: 4966–4977.

Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M., and Goodnow, C.C. (1995). CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺T cells. *Nature* 376: 181–184.

Rathmell, J.C., Townsend, S.E., Xu, J.C., Flavell, R.A., and Goodnow, C.C. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87: 319–329.

Raz, E., Brezis, M., Rosenmann, E., and Eilat, D. (1989). Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J. Immunol.* 142: 3076–3082.

Rice, G.I., Forte, G.M.A., Szykiewicz, M., Chase, D.S., Aeby, A., Abdel-Hamid, M.S., Ackroyd, S., Allcock, R., Bailey, K.M., Balottin, U., *et al.* (2013). Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol.* 12: 1159–1169.

Rönnblom, L. (2016). The importance of the type I interferon system in autoimmunity. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34: S21–S24.

Rönnblom, L., and Alm, G. V (2003). Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res. Ther.* 5: 68–75.

Rosenberg, J.M., Maccari, M.E., Barzaghi, F., Allenspach, E.J., Pignata, C., Weber, G., Torgerson, T.R., Utz, P.J., and Bacchetta, R. (2018). Neutralizing Anti-Cytokine Autoantibodies Against Interferon- α in Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-Linked. *Front. Immunol.* 9: 544.

- Schroeder, H.W., Cavacini, L., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: S41-52.
- Shao, W.-H., and Cohen, P.L. (2011). Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 13: 202.
- Shlomchik, M.J., Aucoin, A.H., Pisetsky, D.S., and Weigert, M.G. (1987a). Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 9150–9154.
- Shlomchik, M.J., Marshak-Rothstein, A., Wolfowicz, C.B., Rothstein, T.L., and Weigert, M.G. (1987b). The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328: 805–811.
- Sjöwall, C., Ernerudh, J., Bengtsson, A.A., Sturfelt, G., and Skogh, T. (2004). Reduced anti-TNFalpha autoantibody levels coincide with flare in systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 22: 315–323.
- Smith, K.G., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1995). FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 11628–11632.
- Suurmond, J., and Diamond, B. (2015). Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: Specificity and pathogenicity. *J. Clin. Invest.* 125: 2194–2202.
- Svenson, M., Poulsen, L.K., Fomsgaard, A., and Bendtzen, K. (1989). IgG autoantibodies against interleukin 1 alpha in sera of normal individuals. *Scand. J. Immunol.* 29: 489–492.
- Svenson, M., Hansen, M.B., Ross, C., Diamant, M., Rieneck, K., Nielsen, H., and Bendtzen, K. (1998). Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* 91: 2054–2061.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969–976.
- Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 1271–1277.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177: 1009–1020.
- Tóth, B., Wolff, A.S.B., Halász, Z., Tar, A., Szüts, P., Ilyés, I., Erdős, M., Szegedi, G., Husebye, E.S., Zeher, M., *et al.* (2010). Novel sequence variation of *AIRE* and detection of interferon- ω antibodies in early infancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 72: 641–647.
- Uchida, K., Nakata, K., Trapnell, B.C., Terakawa, T., Hamano, E., Mikami, A., Matsushita, I., Seymour, J.F., Oh-Eda, M., Ishige, I., *et al.* (2003). High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103: 1089–1098.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* 143: 592–605.

- Viglianti, G.A., Lau, C.M., Hanley, T.M., Miko, B.A., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A. (2003). Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 19: 837–847.
- Walter, J.E., Rosen, L.B., Csomos, K., Rosenberg, J.M., Mathew, D., Keszeti, M., Ujhazi, B., Chen, K., Lee, Y.N., Tirosh, I., *et al.* (2016). Broad-spectrum antibodies against self-antigens and cytokines in RAG deficiency. *J. Clin. Invest.* 126: 4389–4389.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* (80-). 301: 1374–1377.
- Wolfe, F., and Sharp, J.T. (1998). Radiographic outcome of recent-onset rheumatoid arthritis: A 19-year study of radiographic progression. *Arthritis Rheum.* 41: 1571–1582.
- Ytterberg, S.R., and Schnitzer, T.J. (1982). Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 401–406.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201: 703–711.
- Zhang, H., Li, P., Wu, D., Xu, D., Hou, Y., Wang, Q., Li, M., Li, Y., Zeng, X., Zhang, F., *et al.* (2015). Serum IgG Subclasses in Autoimmune Diseases. *Medicine (Baltimore)*. 94: e387.
- Zhang, L., Barker, J.M., Babu, S., Su, M., Stenerson, M., Cheng, M., Shum, A., Zamir, E., Badolato, R., Law, A., *et al.* (2007). A robust immunoassay for anti-interferon autoantibodies that is highly specific for patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Clin. Immunol.* 125: 131–137.

B) Raamat

- Plotkin, Stanley A., Orenstein, Walter A., Offit, Paul A. (2008). „Vaccines, Fifth Edition“. Saunders/Elsevier, Philadelphia.
- Rose, Noel R., ja Mackay, Ian R. (2006). „The Autoimmune Diseases, Fourth Edition“. Autoimmune Diseases, p. 351-357. Elsevier Academic Press.
- Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P., Reimand, K. (2015). „Immunoloogia: Õpik kõrgkoolidele.“ Autoimmuunsus, p. 218-228. Tartu Ülikooli Kirjastus, Eesti.
- Wood, Peter J. (2006). „Understanding Immunology, Second Edition“. Autoimmune diseases, p. 216-220. Pearson Education.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <http://www.phadia.com/en-US/Autoimmunity-diagnostics/Diseases/> (19.05.2018)
2. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/systemic-lupus-erythematosus> (19.05.2018)
3. <https://www.lupusil.org/what-are-the-sledai-and-bilag-evaluations.html> (05.05.2018)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liis Haljasmägi

(sünnikuupäev: 28.08.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„I tüüpi interferoonide vastased neutraliseerivad autoantikehad süsteemse erütematoosse luupuse patsientidel“,

mille juhendajad on Kai Kisand, Pärt Peterson ja Lili Milani

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 28.05.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018

